

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Estudio de la estabilidad de la cromatina en
espermatozoides ovinos de la raza Junín**

TESIS

para optar el grado de Magíster en Producción y Reproducción Animal

AUTOR

Leonidas Alberto Alponente Sierra

ASESOR

Víctor Leyva Vallejos

Lima-Perú

2009

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que debo agradecer que este trabajo se haya podido llevar a cabo:

Al Dr. Víctor Leyva Vallejos, por haber contribuido de manera alturada en mi formación profesional, con su esfuerzo y tiempo, y por haberme transmitido el afecto que siento por lo que hago.

Al Dr. Sergio Cueva Moreno, por el ánimo en la continuación de los borradores de la tesis.

Al Dr. Alexei Santiani Acosta, por soportarme con paciencia en esta etapa final tan dura, y porque el tiempo nos permita establecer una excelente relación profesional.

A la Dra. Martha Valdivia Cuya, por su interés en mi trabajo y por su apoyo en la continuación de la investigación.

Al Dr. Raúl Rosadio Alcántara, por su camaradería, sobre todo en esta última etapa de la redacción.

A la MV Amparo Huamán Cristobal, por su apoyo en el manejo de campo de los animales en la Estación IVITA El Mantaro de la UNMSM.

Al resto de personal de IVITA, sobre todo al personal técnico que me ayudo con los carneros a tenerlos listos para los muestreos.

A los ingenieros zootecnistas de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional del Centro del Perú, en especial al Ing. Mag. Ide Unchupaico Payano.

A SILVIA por todo, pero fundamentalmente por su infinita paciencia y apoyo incondicional, especialmente en esta fase final.

A mis padres Julio y Victoria, que Dios los ampare siempre, gracias a ellos por todo lo que tengo en la vida.

Contenido

	P á g s .
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
GLOSARIO	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Características del Ovino Junín	
2.2 Control endocrino reproductivo del macho	
2.3 Espermatogénesis Fisiología del espermatozoide	
2.4 Integridad de membrana estructural y fisiológica	
2.5 Motilidad espermática	
2.6 Concentración espermática	
2.7 Morfología de los espermatozoides	
2.8 La cromatina y su estabilidad en espermatozoides de ovino	
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Lugar de estudio	
3.2 Animales y manejo	
3.3 Procedimiento experimental	
3.3.1 Tamaño de muestra	
3.3.2 Diseño experimental	
3.3.3 Evaluación de la morfología y fisiología de la membrana espermática	
3.3.4 Grados de compactación de la cromatina nuclear	
3.3.5 Selección de eyaculados de semen	
3.4 Colección de muestras de semen	
3.5 Evaluación de la tasa de preñez relacionada con la estabilidad de la cromatina espermática	
3.6 Análisis estadístico	

IV.	RESULTADOS	33
4.1	Evaluación macroscópica y microscópica del eyaculado	
4.2	Evaluación de la integridad de membrana estructural y fisiológica de los espermatozoides de ovino	
4.3	Análisis Split Plot sobre las técnicas, los tiempos de muestreo y los grados de compactación de la cromatina	
4.4	Evaluación de índices reproductivos de ovinos Junín y su relación con la estabilidad de la cromatina espermática	
V.	DISCUSIÓN	39
VI.	CONCLUSIONES	46
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
VIII.	ANEXOS.....	52

Glosario

BB : Buffer Borato
SDS : Sodio Dodecil Sulfato
EDTA : Etilen Diamino Tetra Acetato

Listado de Cuadros

Cuadro N° 01: Cuantificación de la motilidad masal en semen puro.

Cuadro N° 02: Concentración de semen de carnero determinado en base a la consistencia.

Cuadro N° 03: Identificación de carneros de experimento y borregas de empadre

Cuadro N° 04: Diseño experimental de parcelas divididas

Cuadro N° 05: Concentración, volumen, morfología y motilidad ($X \pm D.S$) de eyaculados de carnero usados en el estudio de la estabilidad de la cromatina

Cuadro N° 06: Comparación entre valores de integridad de membrana estructural (eosina) y fisiológica (hipo osmótico)

Cuadro N° 07: Correlación entre el test hipoosmótico (fisiológico) y técnica de eosina (estructural) usados en el estudio de la estabilidad de la cromatina

Cuadro N° 08: Correlación entre integridad de membrana estructural (eosina) y fisiológico (test hipoosmótico) versus morfología y motilidad

Cuadro N° 09: Análisis de Parcelas Divididas que mide el nivel de las interacciones entre los animales, las técnicas, los meses y los grados de compactación

Cuadro N° 10: Porcentaje de Preñez y su relación con el Grado de compactación de la cromatina espermática

Cuadro N° 11: Número de borregas al empadre, servidas y preñadas por carnero y porcentaje de servidas

Cuadro N° 12: Carneros que Preñaron y no preñaron a las borregas

Resumen

Este estudio, se espera contribuya al conocimiento de la biología celular en los gametos de ovinos de la raza Junín por los pocos estudios en poblaciones espermáticas de estos ovinos, se han descrito las principales características de la membrana espermática como son su estructura y función, las cuales son importantes para establecer el grado de potencial fértil en las poblaciones de espermatozoides, el cual fue alto al correlacionar los efectos de la eosina y la prueba hiposmótica con los valores de morfología y motilidad; valores éstos que indicarían que se usaron poblaciones de espermatozoides que permitan lograr resultados positivos en programas de mejora genética usando inseminación artificial y fecundación in vitro, además de conservar una fuente de recursos genéticos. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la estabilidad de la cromatina en espermatozoides de ovino (5 machos) y asociarla con la integridad de membrana estructural y fisiológica, además de su relación con la tasa de preñez (75 borregas). El diseño experimental usado para evaluar los grados de compactación de la cromatina de espermatozoides de ovinos Junín fue el de Parcelas Divididas (Split Plot), que han interactuado con el tiempo de muestreo y las técnicas empleadas (BB, SDS y EDTA) que tuvieron una alta significancia entre los grados de compactación, así como entre los meses y el grado de compactación, sin importar cual es el animal evaluado. Los resultados muestran que las diferencias entre las técnicas no son significativas, pero si entre los grados de compactación ($P < 0.0001$). La interrelación entre las técnicas y los grados de compactación es muy significativa ($P < 0.0001$). La correlación entre la integridad de membrana estructural (eosina) y fisiológica (hiposmótico) con morfología y motilidad tienen un $P < 0.002$. Con relación a la tasa de preñez, se tiene un $P > 0.05$, luego del empadre con los cinco ovinos machos se han obtenido altos porcentajes de parición ($>75\%$) lo que nos dice del potencial fértil en los machos cuyas muestras de semen se estudiaron. Se concluye, que en general, la técnica para ver los grados de compactación de la cromatina tiene una alta probabilidad en poder dar un diagnóstico inicial del futuro potencial fértil de poblaciones de espermatozoides en la especie ovina.

Palabras claves: Estabilidad de la cromatina en espermatozoides, integridad de la membrana espermática; ovinos de la raza Junín.

Abstract

This study should contribute to knowledge of gametes cell biology in Junin rams, because few researchs on the sperm population of Junin ram. It has been described the main characteristic of the plasmatic membrane like its structure and physiology, both of them are important in order to state if there was activity of predicting fertility in sperm populations, that is was very high relationship between effects of eosin and hypoosmotic swelling test with values of morphology and motility, these values are common in test to evidence that we were working with sperm populations in order to achieve positives outcomes in genetic improvement programs using artificial insemination and in vitro fertilization, besides to conserve a source of genetics resources. The objective of this research was to evaluate nuclear chromatin stability in ram sperm (5 rams) and the association with structural and functional integrity of ram membrane beside its relation with pregnancy rate (75 sheeps). The experimental design was Split Plot to evaluate nuclear condensation of sperm chromatin in Junin rams, they are interacted with each month and used techniques (BB, SDS, and EDTA), they had high significance between nuclear condensation values, no matter which animal was evaluated. Besides differences between treatments are no significant but so between nuclear condensations values ($P < 0.0001$). The relationship between structural and functional integrity of membrane with morphology and motility was ($P < 0.002$). With regard to pregnancy rate ($>75\%$), it was said about fertility potencial of rams sperms populations that were studied. It was concluded in general that techniques to evaluate nuclear condensation values does have a high likelihood to give diagnosis about future potential of sperm populations in Junin ram.

Key words: chromatin sperm stability, membrane integrity, Junin rams

I. Introducción

En el espermatozoide, la cromatina espermática formada de ADN y de las nucleoproteínas protaminas unidas por puentes de disulfuro, es una estructura organizada, condensada, compacta e insoluble que protege la integridad genética del genoma (Evenson et al., 2002). La variabilidad entre especies se atribuye a la proporción de protaminas; en el hombre es menor que en el toro, caballo, hámster y ratón, debido a la retención de 15 % de histonas resultando en la formación o retención de nucleosomas menos compactos. En contraste, los espermatozoides del toro, rata, **carnero**, cerdo y cuy, poseen un sólo tipo de protamina (P1), mientras que el humano tiene un segundo (P2), el cual es deficiente en residuos de cisteína (Evenson et al., 2002), en consecuencia resultan con bajos niveles de grupos sulfhidrilos libres utilizados para la unión de los puentes disulfuro, siendo así la descondensación de su cromatina menos estable que el de especies que poseen una sola protamina P1 (**carnero**), con mayor estabilidad. (Evenson et al., 2002).

Evidencias reportan que las variaciones en la arquitectura de la cromatina espermática afectan el inicio y la regulación de la actividad génica paterna en el desarrollo inicial de un embrión (Hammadeh y col., 1998). La asociación de protaminas e histonas con secuencias de ADN es específica, por lo tanto importante en la expresión génica (McCarthy y Ward, 2000) y ésta en el pronúcleo masculino es acetilado y transcripcionalmente activo durante el desarrollo embrionario temprano; en consecuencia, anormalidades en el genoma de machos han demostrado que conducen a una falla en la viabilidad de la post fecundación (Evenson et al., 2002).

Los ovocitos y embriones tempranos han demostrado que reparan el ADN alterado (Evenson et al., 2002). En consecuencia, el efecto biológico de una anormal estructura de la cromatina espermática dependerá de los efectos combinados sobre el nivel de daño en la cromatina del espermatozoide y la capacidad del ovocito para reparar el daño preexistente. Si los espermatozoides son seleccionados de muestras con daño extenso

del ADN y usados para la fecundación in Vitro, la capacidad de reparación de los ovocitos puede ser inadecuada, resultando en una baja tasa de desarrollo embrionario y alta pérdida de preñez inicial.

El uso de una técnica que proporcione información biológica sobre alteraciones del ADN nuclear del espermatozoide, como lo es la prueba de la Estructura de la Cromatina Espermática (PECE) usada en humanos (Evenson et al., 2002), sería útil en casos de mortalidad embrionaria en animales de granja, para detectar si la fecundación provino del semen de un macho con espermatozoides con ADN alterado; esto resultaría práctico para evaluar la capacidad fertilizante de un macho de alto potencial genético, que es el propósito de este estudio, el cual se realizó con semen de ovinos reproductores de la raza Junín y los resultados de esta prueba evaluados con la tasa de preñez de borregas Junín.

Además, la integridad de membrana es muy importante para el metabolismo, la capacitación espermática, la reacción acrosomal y la unión del espermatozoide a la superficie del ovocito. El daño de la membrana plasmática puede causar la pérdida de la normal función espermática, que implica la disminución de la motilidad, la viabilidad y la capacidad fertilizante.

Por lo expuesto, los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la estabilidad de la cromatina en espermatozoides de ovino y relacionarla con la integridad de membrana estructural y fisiológica, y con la tasa de preñez.

II. Revisión Bibliográfica

2.1 CARACTERISTICAS DEL OVINO JUNIN

Según Gamarra y Villarroel (1978), el ovino Junín tiene como origen y bases el mejoramiento genético por selección y un apareamiento selectivo desarrollado por Neale. Desde el año 1955, el Sr. Zinder importó de los Estados Unidos 260 reproductores de las razas siguientes: Columbia 113; Corriedale Americano 72 ; Panamá 40 y Warhill 35; luego en el año de 1956 se formaron las clases de Stud, A, B y C y en el año de 1960 se inició la selección masal y un apareamiento selectivo en rebaños cerrados. En el año 1973 una genetista a nivel mundial, sugiere que a este ovino se le debería de considerar como una raza por sus cualidades productivas y reproductivas propias de una raza.

Gamarra y Villarroel (1978) indican que el ovino Junín se formó a partir del cruce del ganado criollo por Corriedale (1954), luego seleccionados en cuatro líneas para ser cruzadas con Columbia (43%), Corriedale Americano (28%), Panamá (15%) y Warhill (13%). Estas cuatro líneas separadas hasta completar la generación, luego entrecruzarlas entre si por cuatro generaciones.

Gamarra y Villarroel (1978), afirman que el ovino Junín es de doble propósito (carne y lana), de conformación equilibrada, forma robusta, correspondiente a un animal rústico dentro de un buen tamaño, buenos aplomos, fortaleza de esqueleto, pecho amplio, gran profundidad de cuerpo, sin cuernos, cara descubierta, sin pliegues. El peso es de alrededor de 75 kg en carneros, de 46 kg en borregas, de 23 kg en corderos al destete y de 34 kg en carnerillos de 9 meses. Su finura de lana va de 23 a 25 micras, con una longitud de mecha de 12 cm. en carneros y de 9 cm en borregas con un rendimiento de carcaza del 50% derillos.

2.2 CONTROL NEUROENDOCRINO REPRODUCTIVO DEL MACHO

Eje hipotálamo- hipófisis- testículos

Para el funcionamiento testicular normal se requiere estimulación hormonal por gonadotropinas, las cuales a su vez son controladas por la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo. Es esencial el apoyo de la hipófisis. El control de la espermatogénesis depende de las gonadotropinas y la testosterona. El hipotálamo libera GnRH (en pulsos separados) y la hipófisis anterior secreta FSH y LH. Esta última actúa sobre las células de Leydig. La hormona se une a receptores presentes en la membrana celular de estas células y las estimula para que produzcan y secreten testosterona. La testosterona liberada en la circulación ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior y el hipotálamo. La FSH actúa sobre las células de Sertoli. La FSH y la testosterona actúan en forma conjunta sobre las células de Sertoli para inducir la secreción de sustancias paracrinas que promueven la liberación de espermatogonios y la diferenciación en espermatozoides. Las células de Sertoli también secretan otras sustancias, como algunos compuestos que nutren a los espermatozoides en vías de desarrollo; inhibina que suprime la secreción de FSH desde la hipófisis anterior, y un líquido que ocupa la luz de los túbulos seminíferos. Este líquido contiene una proteína denominada **proteína fijadora de andrógeno** que se une a la testosterona y mantiene una concentración elevada de esta hormona en la luz tubular.

Como se mencionó, la testosterona y la inhibina ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior y el hipotálamo, lo que mantiene una secreción relativamente reducida y constante de FSH y LH. Este patrón contrasta con claridad con las variaciones de las secreciones ovárica, hipotalámica e hipofisiaria anterior que se producen durante los ciclos estrales de las hembras. Sin embargo, en algunas especies de mamíferos la función testicular es variable. (Hafez, E.S.E., 2002)

Los niveles constantes de hormonas en la mayoría de los machos mamíferos permiten la producción incesante de espermatozoides. Estos se forman en las paredes de los túbulos seminíferos. Los espermatozoides maduros poseen una cola flagelar, un orgánulo ocupado por enzimas llamado *acrosoma* y una *pieza intermedia* que almacena mitocondrias.

2.3 ESPERMATOGÉNESIS. FISIOLÓGÍA DEL ESPERMATOZOIDE. ESPERMIOGÉNESIS.

El epitelio seminífero, que reviste los túbulos seminíferos, está compuesto de dos tipos básicos de células: las de Sertoli y las células germinales en desarrollo. Estas últimas experimentan una serie continua de divisiones celulares y cambios, que comienzan en la periferia y avanzan hacia la luz del túbulo. Las células madre, llamadas *espermátogonios*, se dividen varias veces antes de formar espermátocitos. Luego, estos experimentan una meiosis que reduce su contenido de ADN a la mitad del que tienen las células somáticas. Esta serie de divisiones celulares, incluyendo la proliferación de los espermátogonios y las divisiones meióticas, se conoce como *espermátocitogénesis*. Las células haploides que resultan de este proceso son las *espermátides*, las cuales pasan por una serie de cambios estructurales y de desarrollo para formar los espermatozoides. Estos cambios metamórficos constituyen la *espermioagénesis*. Las células germinales en desarrollo están estrechamente asociadas a las grandes células de Sertoli o sustentaculares que las rodean durante el desarrollo.

Espermátocitogénesis: En el macho la meiosis y la espermátogénesis no empiezan hasta la pubertad y desde entonces se producen de manera continua en el epitelio que forma la pared de unos largos y enrollados tubos del testículo, los *túbulos seminíferos*. Las células germinales inmaduras, las *espermátogonias*, se localizan alrededor del límite externo de estos túbulos junto a la lámina basal, donde proliferan continuamente por mitosis. Algunas de las células hijas paran la proliferación y se diferencian en *espermátocitos primarios*. Estos entran en la profase meiótica, en la que se aparean los cromosomas homólogos y se producen los entrecruzamientos, y después continúan hasta terminar la división meiótica I, dando lugar a dos *espermátocitos secundarios*, cada uno de los cuales tiene número de cromosomas autonómicos duplicado y un cromosoma X ó Y. Los dos espermátocitos secundarios procedentes de un espermátocito primario entran en la segunda división meiótica, produciendo cuatro *espermátidas*, cada una de las cuales tiene una dotación cromosómica haploide. Las espermátidas experimentan una diferenciación morfológica que las transforma en espermatozoides, los cuales son liberados a la luz del túbulo seminífero. A continuación los espermatozoides pasan por el *epidídimo*, un tubo muy sinuoso que se encuentra pegado a los testículos, donde son almacenados y donde se produce su maduración final.

Espermioagénesis: Las espermátides, redondas, se transforman en espermatozoides por una serie de cambios morfológicos progresivos llamados colectivamente *espermioagénesis*. Entre estos cambios se incluyen la condensación de la cromatina nuclear, formación de la cola o aparato flagelar de los espermatozoides y desarrollo del casquete acrosómico.

Las diversas etapas de la transformación de las espermatídes se identifican fácilmente con la reacción de *Schiff*. Se observan cuatro fases en este proceso.

Fase de Golgi: se caracteriza por la formación de gránulos proacrosómicos positivos dentro del aparato de Golgi, luego se forman en uno solo, la adhesión del gránulo acrosómico resultante a la envoltura nuclear, y las etapas tempranas de la formación de la cola en el polo opuesto al de la adhesión del gránulo acrosómico.

Fase de encasquetamiento: Consiste en la dispersión del gránulo acrosómico adhesivo en la superficie del núcleo de la espermatíde. Este proceso continúa hasta que casi dos tercios de la porción anterior del núcleo de cada espermatíde quedan cubiertos por un delgado saco membranoso de doble capa que se adhiere íntimamente a la envoltura nuclear.

Fase acrosómica: Se caracteriza por cambios en los núcleos, los acrosomas y las colas de las espermatídes en desarrollo. Tales cambios son facilitados por la rotación de cada espermatíde, de modo que el acrosoma se dirige hacia la base o la pared externa del túbulo seminífero y la cola se dirige hacia la luz. Los cambios nucleares incluyen condensación de la cromatina en gránulos densos y remodelación del núcleo, de esferoide a alargado y aplanado.

Fase de Maduración: Comprende la transformación final de las espermatídes alargadas en células que serán liberadas en la luz del túbulo seminífero. La remodelación del núcleo y el acrosoma de cada espermatíde, iniciada durante la fase previa, produce espermatozoides característicos para cada especie. Dentro del núcleo, los gránulos de cromatina experimentan condensación progresiva hasta que se transforma en un fino material homogéneo que llena todo el núcleo espermático de modo uniforme.

2.4 INTEGRIDAD DE MEMBRANA ESTRUCTURAL Y FISIOLÓGICA

La integridad de membrana es muy importante para el metabolismo, la capacitación, la reacción acrosomal y la unión del espermatozoide a la superficie del ovocito. El daño de la membrana plasmática puede causar la pérdida de la normal función espermática, tales como, la motilidad, la viabilidad y la capacidad fertilizante. Una propiedad de la membrana espermática es la habilidad de permitir el transporte selectivo de las moléculas. La exposición del espermatozoide de mamíferos a condiciones hiposmóticas ha demostrado que causa un influjo de agua a través de la membrana y resulta en un incremento del volumen espermático e hinchamiento de la membrana plasmática. La capacidad de la cola del espermatozoide para hincharse en presencia de una solución hipoosmótica es señal

que el transporte de agua a través de la membrana ocurre normalmente, así, la prueba hipoosmótica que hincha la cola del espermatozoide puede usarse para la evaluación de la integridad de membrana y su actividad funcional normal.

Una propiedad de la membrana celular es su habilidad en permitir el transporte de moléculas de modo selectivo. Cuando se expone el espermatozoide a condiciones hiposmóticas, el agua entra al espermatozoide en un intento de alcanzar el equilibrio osmótico. El flujo de agua va a aumentar el volumen del espermatozoide y la membrana plasmática se hincha. La cola del espermatozoide parece ser muy sensible a las condiciones hipo osmóticas. Esto causa alteraciones en la morfología espermática, lo cual es visible al microscopio óptico. Estas observaciones pueden ser útiles cuando el análisis del semen son dirigidos hacia un diagnóstico de la infertilidad.

La prueba de eosina Y mide la integridad estructural de la membrana, mientras que la prueba hipo osmótica evalúa la integridad fisiológica de la membrana espermática. (Jeyendran, 1984).

En el diagnóstico de la infertilidad del macho, se evalúan diversas características espermáticas. Sin embargo, una limitada atención se ha dado a la evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática. La integridad de membrana no sólo es importante para el metabolismo del espermatozoide, pues además, un cambio correcto en las propiedades de la membrana es requerido para la unión exitosa de los gametos masculino y femenino; así como para la capacitación espermática, la reacción acrosomal y la unión del espermatozoide a la superficie del ovocito. Así, la integridad y la actividad funcional de la membrana espermática es muy importante en el proceso de fertilización y evaluación de la función de membrana, tal vez un útil indicador de la capacidad fecundante del espermatozoide (Jeyendran et al, 1984)

La membrana plasmática del espermatozoide de mamíferos tiene la propiedad de adsorber una variedad de sustancias de su medio ambiente (antígenos, glicoproteínas, ácido siálico). Algunas de estas vienen del epitelio seminífero, epidídimo y vasos deferentes. Después de la eyaculación, la superficie del espermatozoide esta cubierta con componentes del plasma seminal. Algunos de estos materiales que cubren la superficie están fuertemente unidos al espermatozoide que no pueden ser eludidos fácilmente por un simple lavado con solución salina fisiológica o solventes orgánicos. La idea es que la remoción o alteración de los materiales que los cubren sea parte de la capacitación. La remoción o alteración de materiales que cubren la superficie del espermatozoide antes que este expuesto al plasma seminal es igual o más importante para la capacitación.

La membrana plasmática que se halla sobre la cabeza del espermatozoide se cree que sea el mayor sitio en contacto o cubierto por materiales durante la maduración epididimal y la eyaculación.

Sin embargo, el contacto con los materiales puede ocurrir en otras partes del espermatozoide. Así, la remoción o alteración de la membrana puede ocurrir en cualquier parte de la superficie del espermatozoide durante la capacitación, aunque la tasa, grado o manera de remoción o alteración pueden divergir en diferentes regiones del espermatozoide.

Existen cambios asociados a la membrana plasmática con la capacitación del espermatozoide, por ejemplo: pérdida o alteración de materiales adsorbidos, cambios en propiedades de la proteína, pérdida parcial de sitios de unión con lectina, reducción de carga negativa en superficie, reducción de grupos libres SH y NH₂, cambios en fosfolípidos, cambios en la fluidez, cambios en el patrón de distribución de partículas intra membrana, cambios en la permeabilidad y propiedades osmóticas, remoción o alteración del colesterol, del Zn²⁺, aumento en la susceptibilidad a globulinas, aumento en la susceptibilidad a fluido folicular, en la susceptibilidad a leucocitos, exposición o activación de sitios de Ca²⁺.

El acrosoma, es una estructura relativamente inestable que puede ser espontáneamente inducida. La importancia de la reacción acrosomal es reconocida en la fecundación de mamíferos, se ha reportado que los capuchones acrosomales de espermatozoides de roedores muy móviles, se modificaron y luego se perdieron, antes de que el espermatozoide penetrara la zona pelúcida. Se ha observado que la reacción acrosomal en espermatozoides de mamíferos implica la vesiculación de la membrana o múltiples fusiones entre las membranas plasmática y acrosomal externa subyacente. La reacción acrosomal es el resultado de la liberación o exposición de enzimas del acrosoma, por lo que es razonable asumir que la reacción empieza normalmente en las cercanías del ovocito o luego del contacto con el cumulus oophorus alrededor del huevo. La velocidad de la reacción varía de acuerdo a las especies y las condiciones del medio que rodean al espermatozoide (Yanagimachi, 1981).

Como se ha dicho, la superficie de espermatozoides del eyaculado fresco está cubierta con sustancias macromoleculares. Estas sustancias parecen proteger o estabilizar la membrana plasmática y prevenir que el espermatozoide sufra una reacción acrosomal prematura. Durante la capacitación algunas o todas las moléculas de superficie deben ser removidas o modificadas, para que la membrana plasmática del espermatozoide sea

capaz de fusionarse con la membrana acrosomal externa subyacente. Los componentes del plasma seminal (glicoproteínas) adicionados al medio del espermatozoide previenen el inicio de la reacción acrosomal. Los componentes del plasma seminal o sustancias adsorbidas por la superficie del espermatozoide durante la maduración en el epidídimo pueden prevenir el rearrreglo de partículas intramembrana y así bloquear un paso esencial de la reacción acrosomal. Cambios en la composición y arreglo espacial de lípidos de membrana pueden ser importantes para la reacción acrosomal. El contenido de colesterol en la membrana plasmática del espermatozoide disminuye, debido a la absorción de albúmina extracelular durante la capacitación, y esta disminución es esencial para que ocurra la reacción acrosomal. Se ha sugerido que los lisofosfolípidos (lisofosfatidilcolina) y fosfatidilserina están involucrados en la preparación de las membranas espermáticas para la reacción acrosomal.

El número de espermatozoides presentes cerca del ovocito al momento de la fecundación *in vivo* es muy reducido.

Enzimas acrosomales están implicadas en la penetración del espermatozoide a través del cumulus oophorus, puesto que la matriz del cumulus esta hecha principalmente de polímeros de ácido hialurónico y los acrosomas de los espermatozoides de mamíferos son ricos en hialuronidasa. Inhibidores sintéticos de hialuronidasa bloquean la fecundación.

El mecanismo por el cual las enzimas del acrosoma son liberadas del espermatozoide fecundante se cree se deba a la desaparición de las membranas espermáticas durante la reacción acrosomal. Existen tres posibilidades por las cuales los espermatozoides hayan podido pasar a través del cumulus con el acrosoma intacto. La primera sugiere que algunas enzimas (hialuronidasa) pueden estar unidas a la superficie externa de la membrana plasmática del espermatozoide. Aunque las enzimas liberadas de espermatozoides muertos pueden ser adsorbidas sobre las superficies de espermatozoides antes o durante la eyaculación. La segunda posibilidad es que las enzimas acrosomales sean liberadas a través, tanto de los acrosomas y membranas plasmáticas que estén “intactas” en su forma pero alteradas en su fisiología. Finalmente, los espermatozoides pueden pasar a través del cumulus por medios mecánicos solamente. Es común creer que los espermatozoides con acrosoma entero son incapaces de pasar a través del cumulus compacto que rodea al recién ovulado ovocito (Yanagimachi, 1981).

Los espermatozoides deben adherirse firmemente a la zona pelúcida antes que lo penetren. Los componentes con los que los espermatozoides se adhieren a la superficie

de la zona deben estar localizadas en la cabeza del espermatozoide. Autores mantienen que la membrana plasmática del acrosoma intacto de espermatozoides de roedores se unen a la zona. Se sabe que es la membrana plasmática, después de la fusión con la membrana acrosomal externa durante la reacción acrosomal.

La zona pelúcida es una de los sitios más prominentes de especie específica. La zona de una especie usualmente no permite la penetración del espermatozoide de otra especie. La especificidad no es absoluta. La penetración de la zona pelúcida por espermatozoides extraños debería ser considerada la excepción a la regla. El mayor constituyente de la zona pelúcida es una glicoproteína.

El espermatozoide de conejo que pasó a través de la zona pelúcida se mueve vigorosamente por el espacio perivitelino antes que su cabeza se adhiera al vitelo; después de algunos minutos de adhesión, la totalidad del espermatozoide es incorporado dentro del vitelo. En muchos casos, sin embargo, la cabeza del espermatozoide se adhiere inmediatamente al vitelo sin movimientos desordenados dentro del espacio perivitelino. Se van a detallar los pasos a intervalos desde la entrada del espermatozoide al interior del ovocito de hámster.

- A. El espermatozoide pasa a través de la zona pelúcida moviendo su cola vigorosamente. La cabeza del espermatozoide avanza a través de la zona oblicuamente en todos los casos.
- B. Tan pronto como la cabeza entera pasó a través de la zona, la cabeza se va hacia delante y hace contacto inmediato con la superficie vitelina.
- C. El punto inicial de contacto puede ser la punta de la cabeza del espermatozoide,
- D. Pero la cabeza se recuesta plana casi inmediatamente.
- E. La firme adhesión de la cabeza espermática al vitelo y el vigoroso movimiento de la cola del espermio vibra y rota el vitelo dentro de la zona hasta que casi toda la cola del espermatozoide este dentro del espacio perivitelino.
- F. Luego, repentinamente el vigor del movimiento de la cola disminuye, la cola espermática se mueve ahora muy lentamente e intermitente
- G. Después de 30 minutos, aproximadamente, del contacto inicial de la cabeza del espermatozoide con el espacio perivitelino, la descondensación de la cabeza del espermatozoide se hace evidente.
- H. La cola del espermatozoide es incorporada al interior del vitelo desde la base de la cola hacia la punta, lenta pero establemente.
- I. El desarrollo de los pronúcleos del espermio y del ovocito son vistos en el vitelo dos horas después de la entrada del espermatozoide (Yanagimachi, 1981)

2.5 MOTILIDAD ESPERMÁTICA

El análisis de motilidad se realiza en muestras de semen puro (motilidad masal) y semen diluido (motilidad individual y progresiva). La motilidad masal es la prueba más simple que se realiza en semen puro y cuando el semen se diluye (fresco, refrigerado o congelado), la motilidad individual y progresiva es el mejor indicador de la vitalidad del espermatozoide (Evans y Maxwell, 1987 y Cueto et al, 1993).

a). Motilidad Masal. El semen puro de carnero y de toro exhibió movimiento en ondas cuando se examina al microscopio. La muestra se prepara colocando una gota de semen en una lámina portaobjetos limpia y temperada a 37°C, usando una platina caliente puesta sobre el microscopio a un aumento de 50X a 100X. Se hace un estimado subjetivo de la motilidad basándose en el vigor de las ondas y su actividad se cuantifica en grados (de 0 a 5). Las muestras de semen usado para inseminación artificial deben tener una motilidad masal superior a grado 3 (Evans y Maxwell, 1987) como se observa en el Cuadro N° 01.

Cuadro 01:
Cuantificación de la motilidad masal en semen puro

Grado	Clave	Descripción
5	Muy bueno	Denso, con hondas, moviéndose rápidamente, no pueden observarse espermatozoides individuales, 90% o más de los espermatozoides son activos
4	Bueno	Movimiento vigoroso, poro las hondas y los remolinos no muy rápidos como para grado 5, alrededor de 70 a 85% de espermatozoides son activos.
3	Regular	Solamente pequeño, bajo movimiento de hondas, espermatozoides individuales pueden ser observados 45 a 65% de células espermáticas activas.
2	Pobre	No se forman hondas, pero algún movimiento de espermatozoides es observado, solo 20 a 40% de los espermatozoides esta, vivos y su motilidad es pobre.
1	Muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10%) muestran algún signo de vida, con movimiento estacionario.
0	Muertos	Todos los espermatozoides no se mueven

Fuente: Evans y Maxwell (1987)

b) Motilidad individual y progresiva. Este método es usado para muestras de semen que han sido diluidas y que pueden tener reducida motilidad después del almacenamiento. En este caso se usa un mayor aumento en el microscopio (160X 400X) para observar espermatozoides individuales. La muestra se prepara colocando una gota de semen diluido en una lámina de porta objetos caliente a 37 °C y cubierta con una lámina cubre objeto. Se usará una platina caliente en el microscopio para mantener la temperatura. El operador observará varios campos sobre la lámina y determinará porcentaje de espermatozoides que muestran motilidad progresiva que es un movimiento con dirección de avance. Si la concentración de espermatozoides es bastante alta como para observar espermatozoides individuales, la muestra será diluida; con algún dilutor.

2.6 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

La determinación precisa de la concentración espermática (número de espermatozoides por unidad de volumen) es muy importante, pues de ella depende la tasa de dilución a utilizar. Un semen de carnero de buena calidad contiene 3.5 a 6,0 mil millones de espermatozoides por ml.

La concentración se puede calcular mediante pruebas basadas en consistencia o apariencia del semen, usando el hemocitómetro, colorímetro o contador electrónico de partículas. Los métodos varían en precisión y rapidez: el de consistencia no es preciso, pero es rápido para condiciones de campo (ver Cuadro 02); el hemocitómetro es más lento pero más preciso, el colorímetro es rápido y preciso, pero el equipo puede no estar siempre disponible, el contador electrónico de partículas es muy caro y poco apropiado para su uso en campo (Evans y Maxwell, 1987).

Cuadro 02:
Concentración de semen de carnero determinado en base a la consistencia.

Grado	Consistencia	N° de espermatozoides (x 109)/cc (promedio)	Rango
5	Denso cremoso	5.0	4.5-6.0
4	Cremoso	4.0	3.5-4.5
3	Cremoso acuoso	3.0	2.5-3.5
2	Lechoso	2.0	1.0-2.5
1	Nuboso	0.7	0.3-1.0
0	Claro (acuoso)	Insignificante	

Fuente: Evans y Maxwel (1987).

2.7 MORFOLOGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES

Para Evans y Maxwell (1987) el examen morfológico de espermatozoides es una prueba detallada de calidad de semen. Todos los eyaculados contienen algún espermatozoide anormal, las muestras con una alta proporción de espermatozoides anormales pueden dar bajos resultados en tenuidad. Estos pueden ser detectados en frotices preparados y coloreados en una lámina porta objetos para microscopia Sin embargo, esta técnica es muy tediosa y poco práctica para examinar todos los eyaculados durante un programa de inseminación artificial en el campo. En ese caso es conveniente examinar el semen de los carneros seleccionados al inicio, aunque un chequeo periódico durante el curso del programa es también recomendable.

2.8 LA CROMATINA Y SU ESTABILIDAD EN ESPERMATOZOIDES DE CARNERO

La cromatina del espermatozoide está altamente organizada en una estructura compacta que consiste en ADN y nucleoproteínas heterogéneas. La naturaleza condensada e insoluble de la cromatina espermática protege la integridad genética durante el transporte del genoma paterno a través de los tractos reproductores masculino y femenino. Sin embargo, los paquetes relativamente homogéneos de nucleoproteínas de la cromatina espermática vistas en microscopios de luz y electrónicos, desmienten la importancia de una única y compleja estructura en la expresión del genoma paterno y el desarrollo de embriones iniciales y fetos.

Protamina P1 en toro, **carnero**, rata, cerdo y cuy (guinea pig); los humanos tienen una más el P2. Esto hace menos estable la cromatina en humanos que en el resto de especies. Radicales Súper Oxido afectan la estructura de la cromatina (Evenson et al., 2002).

Existe una amplia variedad de aberraciones en la forma de la cabeza de espermatozoides de toro infértil y un pequeño número de ellos son encontrados también en toros con buena fertilidad.

Como las cabezas de espermatozoides de mamífero contienen algo más que cromatina, la forma de la cabeza y el área deberían estar relacionadas al contenido del ADN y la organización de la cromatina.

EL ADN del espermatozoide de mamíferos es el ADN eucariota más altamente condensado y para propósitos prácticos es bioquímicamente inerte (Ferrari et al, 1998).

El manejo reproductivo en las diferentes especies animales es una de las herramientas más eficaces para expandir caracteres genéticos deseados, cuyos resultados han sido óptimos, tanto en animales de laboratorio como de explotación ganadera (Graham et al, 1987). Es por ello que en las últimas décadas, la investigación se ha dirigido al conocimiento de la biología celular de los gametos.

Los espermatozoides de una variedad de especies: cuy, rata, conejos, hámster, **carnero**, toro y cerdo, sufren un proceso de maduración durante su pasaje por el epidídimo lo que da como resultado el desarrollo de la capacidad fértil, al alcanzar los segmentos distales del epidídimo. Es claro que este órgano contribuye a la maduración del espermatozoide con factores producidos en el epitelio bajo la influencia de andrógenos (Hinrichsen y Blaquier, 1980).

Los espermatozoides de mamíferos, así como el de humanos, no están totalmente maduros cuando son liberados del epitelio seminífero, sino que deben completar su maduración durante su tránsito a través del epidídimo. Los cambios en la función, que se dan en el epidídimo incluyen el desarrollo de la capacidad de motilidad progresiva y la de fecundar al ovocito. Los cambios dentro del espermatozoide que subyacen al desarrollo de estas funciones, incluye alteraciones de la superficie del espermatozoide y un reforzamiento estructural de la pieza media y el cuello que resultan de la formación de puentes bisulfuro; a su vez se forma simultáneamente dentro de la Protamina nuclear lo que resulta en un aumento de la **estabilidad** del núcleo durante su paso por el epidídimo (Blazak y Overstreet, 1982).

La prueba de la estructura cromatinica en espermatozoides es una técnica que evalúa la estabilidad estructural de la cromatina nuclear espermática. Se ha usado bastante en muestras de semen congelado de bovino. Se han desarrollado numerosas pruebas de laboratorio para la evaluación de calidad de semen. Los parámetros mas ampliamente usados en la industria de la inseminación artificial incluyen porcentajes de motilidad y morfología normales (Ballachey et al, 1988).

Estudios de la condensación de la cromatina nuclear durante la espermiogénesis ha mostrado que es un proceso ordenado. Durante la condensación, las histonas son gradualmente reemplazadas hasta protaminas (Ward y Coffey, 1989).

La descondensación de la cromatina nuclear en espermatozoides de mamíferos puede ser inducida por tratamiento con sodio dodecil sulfato (SDS) conteniendo ditiotreitol

(DTT) reactivo que rompe específicamente puentes bisulfuro S-S- (Bedford et al, 1973).

El espermatozoide para fecundar un ovocito requiere de: a) tener motilidad para contactarse con el óvulo y moverse a través del cumulus oophorus y la zona pelúcida; b) tener la capacidad de sufrir la capacitación y la reacción acrosómica; c) tener la capacidad de unirse a la zona pelúcida y la membrana vitelina para adquirir la correcta proteína de unión durante la maduración y la exposición de estos sitios de unión al óvulo en el momento correcto; d) ser capaces de fusionarse con el oolenma y ser incorporado dentro del ovocito. Todas estas diferentes capacidades las va adquiriendo durante su maduración a través de su trayecto por el epidídimo (Williams et al, 1991).

La cromatina del espermatozoide de mamífero sufre un proceso de compactación durante su diferenciación en los testículos. La cromatina compactada adquiere estabilidad durante su paso por el epidídimo. Se ha establecido que la estabilidad de la cromatina es adquirida debido a la presencia del zinc, el cual estabiliza los puentes bisulfuro creados por la unión de los radicales tiol de las cisteínas del ADN, y también de los puentes bisulfuro de las protaminas de la cromatina espermática. Espermatozoides del eyaculado en el líquido seminal entran en contacto con las secreciones del fluido prostático el cual tiene altas concentraciones de zinc, y a su vez con el fluido vesicular el cual contiene ligandos de zinc de alto peso molecular (Kjellberg et al, 1992).

Se sabe que los espermatozoides inmaduros en el epidídimo tienen más baja fertilidad que los espermatozoides maduros del eyaculado. El espermatozoide eyaculado tiene varios grados de estabilidad nuclear. Cuando los espermatozoides son expuestos al detergente SDS o en combinación con el agente reductor de puentes disulfuro DTT, las cabezas con núcleo inmaduro con menos puentes-S-S- sufren rápido la descondensación y se distienden y pueden lisarse (Liu y Baker, 1992).

La prueba de estructura de la cromatina espermática ha sido usada en la evaluación de la susceptibilidad del ADN a la denaturación, en bovinos y hombres. Estos estudios han demostrado una asociación entre la susceptibilidad y la fertilidad en estas especies, o sea, a medida que la susceptibilidad aumenta la fertilidad decrece. Basados en observaciones propias, numerosos caballos infértiles tienen una pobre estructura cromatínica. Se cree que este fenómeno pueda tener significado en relación a algunas formas de infertilidad a nivel del ADN de caballos. La investigación introduce la evaluación de un aspecto de la calidad espermática, la cromatina, que no había sido previamente evaluada en el caballo (Love y Kenney, 1994).

La selección y pronóstico de fertilidad están basados en la rutina de los análisis de parámetros seminales y de comportamiento. Existen algunos métodos desarrollados en el laboratorio que pueden explicar la subfertilidad e infertilidad. Estas pruebas están basadas en la morfología espermática, como el análisis de cromatina, y la funcionalidad de espermatozoides, como motilidad y composición del plasma seminal (Magistrini et al, 1996).

Investigadores consideran que la morfología espermática es el más significativo parámetro para predecir el potencial de fecundación. La morfología del espermatozoide evaluada de acuerdo a estrictos criterios se reportó que es un buen pronosticador de resultados de fecundación in vitro. La calidad del embrión es influenciado por la calidad del semen, en particular, por anormalidades de la cabeza del espermio, lo que sugiere que el gameto masculino juega un importante papel en el estado temprano de la embriogénesis. Una alta proporción de espermatozoides demostraron morfológicamente estar asociados con un aumento en la heterogeneidad de la cromatina. La forma nuclear final, que es especie-específica, depende de la condensación de la cromatina durante la espermiogénesis, así como una precisa organización dentro del núcleo. La condensación de la cromatina es obtenida por una gradual sustitución de lisina, histonas somáticas por histonas específicas de testículos y finalmente por protaminas (Hammadh et al, 1998).

La estabilidad y el contenido de zinc en la cromatina fue estudiada en 10 personas. Se encontró una relación positiva entre el zinc del núcleo espermático y la resistencia de la cromatina a descondensar en sodio dodecil sulfato (SDS). Un bajo contenido de zinc desmejoraría la estabilidad estructural de la cromatina y aumentaría la vulnerabilidad del genoma masculino. Este mecanismo puede ser una explicación a la reducción de la fertilidad (Kvist, U. et al, 1988).

El zinc excretado de la próstata asegura un alto contenido de zinc en el núcleo espermático y contribuye a la estabilidad de la estructura cuaternaria de la cromatina. Después de la eyaculación, un segundo tipo de estabilidad implicaría a los puentes disulfuro. Normalmente el núcleo del espermatozoide eyaculado queda estable y no se descondensa cuando es expuesto al detergente sodio dodecil sulfato (SDS), mientras que un espermatozoide que ha sido expuesto a un agente quelante del zinc, se desestabiliza y descondensa en SDS. Se da una descondensación espontánea en SDS, sin previo tratamiento con agentes quelantes de zinc en algunos hombres infértiles. Lo que indicaría que el espermatozoide que se descondensa espontáneamente tendría un inadecuado contenido de zinc en el eyaculado (Kvist, U. et al, 1987).

Se evaluó la relación entre la estructura de la cromatina nuclear espermática y la fertilidad en dos grupos de toros Holstein: grupo 1, toros maduros y grupo 2, toros jóvenes. Las muestras fueron medidas por la Prueba de estructura de la cromatina espermática (PECE); los espermatozoides fueron inducidos a una denaturación in situ del ADN, teñidos con naranja de acridina y evaluados con flujo citométrico. Los datos sugieren que la PECE sería de valor para identificar la baja fertilidad de machos y la pobre calidad de las muestras de semen (Ballachey et al, 1987).

Como consecuencia de su papel fundamental en la historia viviente de muchos organismos superiores, la fecundación ha sido de gran interés para los científicos por más de un siglo. La fecundación del ovocito por el espermatozoide, por la cual la reproducción sexual se da lugar en casi todos los organismos multicelulares, es fundamental para mantener la vida. Tanto en mamíferos como los que no lo son, el camino que lleva a la fusión de un ovocito con un espermatozoide consiste de muchos pasos que ocurren en orden. Estos pasos incluyen reconocimiento celular especie – específico, fusión de membranas intra e intercelulares y modificaciones catalizadas por enzimas (Wassarman, 1987).

Espermatozoides de mamíferos euterianos se conocen que exhiben un peculiar estado de condensación en su cromatina nuclear el cual es completado durante su tránsito por el epidídimo. Los cambios estructurales de las proteínas nucleares y sus efectos en la organización de las proteínas del ADN se sabe que juegan un papel crucial e el estado de condensación (Royere et al, 1991).

Durante la maduración, muchas estructuras espermáticas, tales como la cromatina, el flagelo, gradualmente se estabilizan. La formación de puentes disulfuro para estabilizar las estructuras espermáticas durante su maduración, sobre todo la cromatina, se ha estudiado por métodos bioquímicos. Se pensó que la oxidación de thiol SH a disulfuro SS está implicado en la condensación de la cromatina y la estabilidad del flagelo, que ocurren durante la maduración del espermatozoide (Seligman y Shalgi, 1991).

El ADN de espermatozoides de mamíferos es el mas compactado ADN en eucariontes, siendo por lo menos 6 veces mas condensado que el ADN de cromosomas mitóticos. Para obtener este grado de empaquetamiento, el ADN espermático interactúa con las protaminas para formar arreglos lineales lado a lado (no hay superenrollamiento) con la cromatina. El núcleo del espermatozoide de mamífero muestra una estructura intrincada que parece reflejar una organización funcional del ADN. Esta estructura no sólo permite transferir de un apretado paquete la información genética al ovocito,

sino que también asegura que esta información sea distribuida en una forma física y químicamente organizada para que la información genética pueda acceder apropiadamente al desarrollo del embrión. (Ward y Coffey, 1991).

Durante los estados finales de la Espermatogénesis de mamíferos, las histonas asociadas al ADN son reemplazadas por protaminas, proteínas básicas de bajo masa molecular que contienen un gran número de residuos cisteína y arginina. El complejo ADN – protamina adquiere una alta compactación, es inerte y transcripcionalmente inactivo. Se propuso que la oxidación de los residuos de cisteína en la protamina a disulfuros juega un papel en la estabilidad del núcleo espermático de varias especies (Seligman et al, 1994).

El establecimiento de la Espermatogénesis de muchas especies ocurre al azar en los testículos con una uniformidad de coloración en el parénquima. Se notó que la maduración estuvo directamente relacionada al peso y el tamaño del testículo. La estación o duración del foto período es conocido que influye en el tamaño testicular y la Espermatogénesis de muchos mamíferos. Factores internos y externos influyen el sistema nervioso central modulando el sistema endocrino (Clemmons et al, 1995).

Se conoce que la nutrición afecta el tamaño testicular y la producción de espermatozoides en carneros. Pero la función endocrina de los testículos no parece ser afectada del mismo modo. Concentraciones periféricas de testosterona son influenciadas por la dieta como resultado de cambios en la pulsatilidad de LH, pero cambios en el tamaño del testículo inducidos por la nutrición no afectan los cambios que induce la LH en concentraciones plasmáticas de testosterona; comparado con otros factores que afectan el crecimiento testicular, como la maduración y el foto período (Hötzel et al, 1998).

Investigadores reportaron las primeras células de la Espermatogénesis mediante estudios electrofisiológicos. Concentraron su atención en los espermatocitos primarios y las espermátides de ratas adultas que son más abundantes. Los espermatocitos primarios tardíos presentaron un núcleo grande con la cromatina condensada. El Ca^{2+} aumenta al interior durante la Espermatogénesis, desde espermatogonia a espermátide temprana. La regulación del Ca^{2+} es importante para la Espermatogénesis y es crítica para la maduración espermática, la capacitación y la reacción acrosomal (Darszon et al, 1999).

En carneros la actividad reproductiva es afectada por un grupo de factores externos como señales socio – sexuales, fotoperíodo y nutrición. En carneros Merino sexualmente

maduros la nutrición es el argumento más poderoso de estos factores y la respuesta a la reproducción puede dividirse en efectos de período corto que actúan sobre todo en el sistema neuroendocrino controlando la actividad testicular, y efectos de período largo que actúan sobre el crecimiento testicular y la producción espermática. En carneros con déficit de energía por baja ingesta de alimentos o exceso de ejercicios, se ha visto que disminuye la secreción de gonadotropinas, incluyendo humanos, y al recuperar patrones normales alimenticios se revierte el déficit de gonadotropinas (Blache et al, 2000).

La estabilidad de la información genética es de vital importancia para la normal función y la reproducción de los seres vivos. Los gametos de machos y hembras son la base para un nuevo individuo y sus genomas intactos aseguran la transmisión del material genético a la siguiente generación. Sin embargo, la evolución no sería posible si los genomas de los gametos no tuvieran algunas mutaciones. La gametogénesis debería tolerar un limitado número de mutaciones. Estos dos requisitos contradictorios, es decir, la estabilidad del genoma versus la inestabilidad debe ser obtenida sobre la base de los caminos de reparación del ADN (Baarends et al, 2001).

Se estudió el efecto de la estacionalidad (medio ambiente temperado) sobre el status de la cromatina en espermatozoides de ovino, venado rojo y oso pardo. El trabajo pretende mejorar las fuentes de recursos genéticos por medio del conocimiento que hay de los efectos de la estación sobre la calidad espermática (García – Macías et al, 2006).

Se observó deficiencia de protamina en hombres infértiles, lo que sugiere que una tasa relativa de histona: protamina puede ser alterada en los espermatozoides de este grupo, en los que se halló una alta proporción de espermatozoides con histonas antes que protaminas (Zhang et al, 2006).

Entre los parámetros clásicos que determinan la buena calidad seminal, tales como, la motilidad espermática, la morfología o el estado de los acrosomas y de las membranas, la integridad de la molécula de ADN es crucial para llevar a cabo una fecundación con éxito. Sin embargo, el estudio del ADN no es sencillo, hecho que ha dificultado su incorporación rutinaria en la elaboración de los seminogramas (Cortés- Gutiérrez et al, 2007).

Estudios anteriores sugieren que la fragmentación del ADN espermático estaría asociada con la aneuploidía (Muriel et al, 2007).

III. Materiales y Métodos

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El manejo y toma de muestras de los animales fue realizado en la Estación Experimental IVITA - El Mantaro, Junín, situado a 3300 metros sobre el nivel del mar. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional del Centro del Perú situado en el kilómetro 5 de la carretera central Huancayo.

3.2 ANIMALES Y MANEJO

Se utilizaron 5 carneros de 02 años y 75 borregas de 3 a 4 años de edad de la raza Junín, de propiedad de la E E. IVITA - El Mantaro.

Los animales, durante el día fueron expuestos al pastoreo en pastos cultivados de gramíneas y leguminosa (Rye grass + trébol), y en las tardes fueron conducidos a los galpones (dormideros) donde recibieron sales minerales y suplemento (Heno).

Los carneros, fueron identificados, además del arete, con cordones alámbricos de colores, y las borregas servidas, además de poseer su propio arete de control fueron identificadas con una cinta del mismo color del macho que la sirvió.

Las identificaciones de los carneros y de las borregas usadas en el estudio se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 03:

Identificación de los carneros y las borregas del experimento

Nº de arete de los carneros	Color de cordón	Edad de los carneros	Número de borregas
750 (1)	Azul	2 años	15
745 (2)	Rojo	2 años	15
729 (3)	Negro	2 años	15
755 (4)	Amarillo	2 años	15
747 (5)	Verde	2 años	15

Se utilizó el sistema de empadre libre y cada carnero fue provisto de una pechera con una esponja impregnada de una solución adherente de un color diferente para cada uno, a fin de identificar a las borregas que empadraron y así controlar su descendencia. En esta actividad, hubieron cuatro ovejas que presentaron doble color en el anca, fácilmente distinguible, debido a la monta de dos machos diferentes, considerándose el primer color para efectos de identificación del macho en el registro de empadre.

El empadre se llevó a cabo desde el 10 de Setiembre al 30 de Octubre del 2005. Cada día, previamente a la salida de los animales de los galpones al campo, las pecheras de los carneros fueron limpiadas y las esponjas recargadas de pintura y paralelamente se verificaron la presencia y el color de la pintura en el anca de las borregas como indicio que fue servida.

La parición fue controlado por personal preparado en la atención, identificación y registró de los nacimientos.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 TAMAÑO DE MUESTRA: Del rebaño de carneros reproductores, se seleccionaron cinco machos en base al fenotipo, edad y condiciones nutricionales. De cada uno se colectó semen cada mes durante cinco meses, obteniéndose un total de 25 eyaculados.

3.3.2 DISEÑO Y PLAN EXPERIMENTAL: Se utilizó el diseño Split Plot (parcelas divididas) y se muestra en el cuadro 4, donde el semen de los carneros (plot mayor) fueron expuestos a tres técnicas (sub plot) para evaluar los grados de compactación (sub sub plot) en función al tiempo (meses de colección).

Cuadro 04:
Diseño Experimental de Parcelas Divididas

	Técnica	Meses	Primer mes			Segundo mes			Tercer mes			Cuarto mes			Quinto mes		
		Grados	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Ani- males (5)	BB																
	SDS																
	EDTA																

El modelo estructural lineal fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \rho_k + \alpha_i + d_{ik} + \beta_j + g_{jk} + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

- μ = la media general de las parcelas A y B
- α_i = efecto del *i*-esimo nivel del factor A (Animales)
- ρ_k = el efecto k del bloque (Técnicas: BB, SDS, EDTA)
- d_{ik} = el error aleatorio de parcela completa (Animales y Técnicas)
- β_j = el efecto j-esimo del factor B (Meses)
- g_{jk} = el error aleatorio de subparcela (Meses y Técnicas)
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = el efecto de la interacción entre las variables (Animales y Meses)
- e_{ijk} = el error aleatorio de la subparcela

Los grados de compactación (sub sub plot) de la cromatina del espermatozoide fue la variable a ser analizada con mayor sensibilidad y para su evaluación, el semen de cada carnero fue sometida a tres soluciones, buffer borato (BB), Sodio Dodecil sulfato (SDS) y Etilen Diamino Tetra Acetato (EDTA). Los grados de compactación fueron evaluados a través de la descondensación de la cromatina causada por las soluciones a las que fueron expuestas. Para el estudio se consideraron tres grados de descondensación:

- Grado 0: Cromatina de la cabeza de espermatozoides no descondensadas.
- Grado 1: Cromatina de la cabeza de espermatozoides moderadamente descondensadas.
- Grado 2: Cromatina de la cabeza de espermatozoides altamente descondensadas.

Como un estudio complementario, a los resultados de los grados de compactación, se utilizaron la técnica de la eosina (vivos y muertos) para evaluar la integridad morfológica y la prueba hipoosmótica (hinchados) para evaluar la integridad fisiológica de la membrana de los espermatozoides.

El efecto de los diferentes grados de compactación, que mide la capacidad fertilizante del macho fue evaluado con la tasa de preñez de las borregas sometidas al empadre.

Metodología de Evaluación

3.3.3 MÉTODOS DE EVALUACIÓN

GRADOS DE COMPACTACIÓN NUCLEAR DE LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE.

Del semen fresco, 20 µl fueron depositados en tres tubos de ensayo, enumerados del 1 al 3; al tubo 1(control) se le agregó 180 µl de buffer borato, al tubo 2 (SDS) 180 µl de SDS al 1 % y al tubo 3 (SDS+EDTA) 180 µl de SDS+EDTA. Estas soluciones fueron incubadas a 40 °C por 60 minutos. Luego se les adicionó 200 µl de gluteraldehído al 2.5 %, se mezcló y dejó en reposo por 10 minutos.

Se hizo un extendido de cada tubo en una lámina portaobjeto, se secó y dejó fijar con metanol por 5 a 10 minutos. Se coloreó con Giemsa al 50% por 40 minutos. Se observó al microscopio en laminas portaobjetos a un aumento de 100 X y 400X. El conteo mínimo fue de 100 espermatozoides por cada una de las tres láminas. Estos grados se diferencian por el tamaño de la cabeza del espermatozoide vistos al microscopio (Método de Kvist,U; modificado por Gonzales, 1992).

EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y LA FISIOLOGÍA DE LA MEMBRANA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE OVINO.

La integridad estructural de la membrana fue evaluada con la técnica de la Eosina Y, y la fisiológica con la Prueba hipoosmótica ; sus valores fueron expresados en forma porcentual (%), de acuerdo al grado de reacción con los reactivos usados. Se consideró un conteo mínimo de 100 espermatozoides por prueba.

El protocolo de las técnicas usadas fueron los siguientes:

Técnica de Eosina Y: Se pesaron 0.5 g de eosina y se diluyeron en 100 ml. de solución salina al 0.9% . Luego se mezcló una gota de semen con una gota de solución de Eosina (0.5 %) en una lámina portaobjetos. Después de dos minutos se observó la preparación a 400X. Los espermatozoides no coloreados se contabilizaron como vivos y los que reaccionaron con la Eosina Y (coloreados) como células muertas (Liu y Baker, 1992).

Prueba Hipoosmótica: En la preparación se usó fructosa (1351 mg), citrato de sodio (735 mg) y 100 ml de agua destilada. Luego se colocaron 0.9 ml de solución hipoosmótica y se agregó 0.1 ml de muestra de semen de ovino. Se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Después de la incubación, la observación de espermatozoides con la cola hinchada

se consideró buena señal de una actividad normal de su fertilidad (Jeyendran et al, 1984); es decir, en la Prueba Hipoosmótica, cuando los espermatozoides vivos con una función normal de su membrana son expuestos a una solución de baja osmolaridad (150 mOsm / L), sus colas se hinchan a causa del ingreso de agua por ósmosis, lo cual es propio de su integridad fisiológica. La prueba hipoosmótica puede correlacionarse con la evaluación de la viabilidad por exclusión con Eosina Y. (Liu y Baker, 1992).

3.4 COLECCIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN:

Al inicio del experimento los carneros fueron entrenados en la técnica de colección de semen con vagina artificial.

Previo al estudio de la estabilidad de la cromatina se evaluó la concentración, morfología y motilidad de los espermatozoides de los eyaculados de semen de los cinco carneros. Luego cada eyaculado fue analizado de modo separado e independiente con las técnicas BB, SDS y EDTA, Eosina y la prueba hipoosmótica.

3.4.1 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL EYACULADO DE OVINO

Las características físicas evaluadas fueron el color, aspecto, motilidad masal, volumen y concentración espermática. Solamente las muestras de espermatozoides que tuvieron motilidad masal entre los grados 4 y 5 (>80% y >90% motilidad) según Evans y Maxwell (1987), fueron usados para la evaluación microscópica a 100X y 400X.

Se trabajó con platina calentable (termostática), dada la influencia que tiene la temperatura sobre la motilidad de los espermatozoides, a fin de evitar el shock térmico en circunstancias extremas de temperatura.

La concentración fue determinada con la técnica del hemocitómetro. Se utilizó la pipeta para glóbulos rojos, la cual se llenó con eyaculado hasta la marca 0.5 para realizar una dilución de 1/200; luego se limpió la punta con gasa para evitar los restos del eyaculado que puedan inducir error en el cálculo, el diluyente (NaCl y formol al 0.2%) se aspiró hasta la marca de 101. Al final se agitó lentamente la pipeta para producir una mezcla homogénea y se descartó las primeras 3 gotas para luego colocar una gota cerca de un extremo de la Cámara Neubauer, a fin de producir una distribución homogénea. Se hizo el recuento con objetivo de 40X, sobre el cuadrado grande central de la cámara

sólo en cinco cuadrados pequeños: uno central y cuatro angulares. Al final se usó el factor de multiplicación (10^4), y se expresa en millones de espermatozoides por mililitro (10^6 spz / ml).

3.5 EVALUACIÓN DE LA TASA DE PREÑEZ RELACIONADA CON LA ESTABILIDAD DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.

Se evaluó la tasa de preñez mediante la tasa de natalidad la cual se evaluó en base al número de crías nacidas, a fin de determinarse la fertilidad de las hembras.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Grados de compactación de la cromatina.

El diseño del Split Plot utilizado como base para evaluar las técnicas y variables fueron analizadas por la Prueba de Análisis de Varianza (ANVA).

La diferencia entre los grados de compactación en la tasa de preñez fue determinada por la tabla del Chi cuadrado.

Se estableció la correlación entre la técnica eosina Y y la prueba hipoosmótica versus la morfología, la concentración y la motilidad. Además, se efectuó un X^2 de contingencia para determinar las diferencias en la concentración, volumen, morfología y motilidad entre las muestras de semen de los carneros.

IV. Resultados

4.1 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL EYACULADO

La evaluación de las características del eyaculado se presenta en el cuadro N° 05, donde se observa que no hubo diferencias en la motilidad, morfología, volumen y concentración espermática, entre los ovinos seleccionados para el estudio de los grados de condensación de la cromatina.

Cuadro 05:

Concentración, volumen, morfología y motilidad ($X \pm D.S$) de eyaculados de carnero usados en el estudio de la estabilidad de la cromatina

Animales	N° Eyac	Concentración spz 106/ml	Volumen ml	Morfología Normales	Motilidad Masal
		5	5	5	5
745	5	2304.±386	0.96±0.45	84. ±6.5	4.6±0.54
729	5	2198. ±220	1.12±0.28	70. ±10.6	4.6±0.55
747	5	2110. ±196	0.90±0.33	89. ±4.2	4.2±0.83
750	5	2228. ±140	0.88±0.35	91.2±4.4	4.0 ±1.0
755	5	2090. ±263	1.56±1.36	92. ±4.5	4.8±0.45
Total	25	2186. ±246	1.08±0.68	85.24±10.2	4.44±0.71
$X^2_{(0.05, 16 gl)} 26.30 > X^2_c 20 NS$					

4.2 EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y LA FISIOLÓGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE OVINO.

Según el cuadro 06, no hubo diferencia significativa entre los ovinos a la técnica de la eosina y a la prueba hipoosmótica; además, los resultados de la fisiología de los espermatozoides obtenidos por ambas pruebas, son reforzados por la asociación significativamente alta entre ellas ($r=0.81$, $p<0.01$) (Cuadro N° 07).

Además, refleja junto con las variables, como morfología una significación estadística de $P< 0.01$ (0.560) en relación a eosina; y una significancia estadística de $P< 0.01$ (0.466) en relación a hipoosmótico, pero en la relación motilidad con eosina no existe significancia estadística, $P> 0.01$ (0.22) (Cuadro N° 08), pero sí hay significancia en relación a motilidad con hipoosmótico $P< 0.01$ (0.35).

Cuadro 06:

Comparación entre valores de integridad estructural (técnica de eosina) y fisiológica (prueba hipoosmótica) de la membrana

Animales	Nº Eyaculado/ carnero	Eosina 100 espermatozoides	Hipo osmótico 100 espermatozoides
745	5	68. \pm 15	60. \pm 12.2
729	5	58. \pm 8.4	61. \pm 7.4
747	5	72. \pm 4.5	75. \pm 12.2
750	5	72. \pm 25.6	68. \pm 32
755	5	77. \pm 11	81. \pm 7.4
Total	25		
$X^2_t (0.05, 16 \text{ gl}) 26.30 > X^2_c 20 \text{ NS}$			

Cuadro 07:

Correlación entre la prueba hipoosmótica (fisiológico) y la técnica de eosina (estructural) usadas en el estudio de la estabilidad de la cromatina

		Hipoosmótico	eosina
hipo osmótico	Correlación Pearson		0.811(**)
	N		25
Eosina (sp vivos)	Correlación Pearson	0.811(**)	
	N	25	

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Cuadro 08:

Correlación entre la integridad estructural (técnica de eosina) y fisiológico (prueba hipoosmótica) de la membrana versus morfología y motilidad de los espermatozoides

	Morfología (%)	Motilidad (0-5)
Eosina (spz. vivos)	0.56 P<0.001	0.22 P>0.056
Hipoosmótico (spz. hinchados)	0.46 P=0.00*	0.35 P=0.002*

4.3 RESULTADOS DE LOS GRADOS DE COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA

En el cuadro 9, no hubo diferencias significativas entre las técnicas (BB, SDS, EDTA) esto implica que el medio utilizado dependería del grado que cada eyaculado tiene; mientras que para los grados de compactación de la cromatina; sin embargo, estas diferencias fueron significativas cuando las técnicas interaccionaron con el período o meses en que se colectó el semen ($P<0.05$).

En el caso de meses que interaccionan con los grados de compactación si existe una diferencia altamente significativa ($P<0.001$). La interacción Mes * compactación al ser significativa, asegura que los 5 meses mantienen condiciones diferentes relativas al grado de compactación, no importa cual animal es evaluado. Sin embargo, el grado de compactación de la cromatina fue afectado ($P<0.0001$), de su interacción (mes * compactación: $P<0.001$) con el mes en que se obtuvo el eyaculado.

La ausencia del efecto animal también fue encontrada en el análisis de parcelas divididas; hubo ausencia del efecto mes (desde el inicio hasta alrededor del final de la estación sexual).

Cuadro 09:

Análisis de Parcelas Divididas que mide el nivel de las interacciones entre los animales, las técnicas, los meses y los grados de compactación

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	F
Animales	4	7.11	1.78	0.02	0.9993
Mes	4	4.89	1.22	0.01	0.9997
Error (a)	16	12.89	0.806	0.01	1.0000
Compactación	2	8820.22	4410.11	46.65	0.0001
Mes* compactación	8	2519.78	314.97	3.33	0.0018
Error(b)	40	17176.67	429.42	4.54	0.0001
Técnicas	2	1.56	0.78	0.01	0.9918
Técnicas * mes	8	8.44	1.06	0.01	1.0000
Técnicas * compactación	4	27587.78	6896.94	72.96	0.0001
Técnica. * mes * compact.	16	2808.89	175.56	1.86	0.0312
Error (c)	120	11343.33	94.528		
Total correcto	224	70291.56			

El grado de compactación tuvo interacción con las técnicas ($P < 0.0001$) y los meses ($P < 0.01$) de evaluación.

Tampoco hubo efecto simple de los animales, del mes en que se colectó el semen; a diferencia de los grados de compactación; sin embargo las diferencias entre las técnicas fueron significativas cuando interaccionan con el mes y los grados de compactación.

En el cuadro 10, muestra que a través de la prueba de Chi cuadrado, no hubo diferencias en la tasa de preñez vs no preñez. Tampoco existe relación estadística ($P > 0.05$), entre los grados de compactación 0, 1 y 2, y su relación con los animales que preñaron y no preñaron. Se obtuvo un promedio para cada técnica que permitió obtener un rango en cada grado de compactación.

Cuadro 10:

Porcentaje de Preñez y su relación con el Grado de compactación de la cromatina espermática

Grados de compactación							Total	
Estado fisiológico	0		1		2			
	(<0.63)		(0.64 a 1.17)		(>1.18)			
	n	%	n	%	n	%	n	%
No preñó	6	24.0%	5	20.0%	8	32.0%	19	25.3%
Preñó	19	76.0%	20	80.0%	17	68.0%	56	74.7%
Total							75	100.0%

4.4 EVALUACIÓN DE ALGUNOS ÍNDICES REPRODUCTIVOS DE LOS OVINOS JUNÍN RELACIONADOS CON LA ESTABILIDAD DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.

En el Cuadro N° 11 son mostrados los resultados de índices reproductivos de las borregas de experimento, teniendo en consideración la estabilidad de la cromatina espermática de los carneros en estudio, donde el carnero 745 reporta el mayor porcentaje de borregas servidas (93.30%), seguido por los carneros 729 y 755 con (86.67%) y los carneros 750 y 747 (80 %).

Referente al número de borregas paridas, porcentaje de prolificidad y sexos de las crías son reportados en el Cuadro N° 11 donde el carnero 745 obtuvo el mayor número de borregas paridas (13), seguido de los carneros 729 y 755, siendo los últimos los carneros 750 y 747.

El porcentaje promedio de prolificidad del experimento fue de 114%, así el carnero 745 (123%) obtuvo el mayor porcentaje de prolificidad, seguido por carnero 755 (118%), luego carnero 729 (116%), carnero 750 (110%) y último el carnero 747 (100%). Esta alta prolificidad de los animales se debe posiblemente al efecto Flushing, en esta especie hay un efecto significativo por alimentación especial antes del empadre, presentándose un incremento de partos mellizos.

Con estos resultados obtenidos y relacionada con la estabilidad de la cromatina espermática, se ha tratado de obtener una idea más clara de la relación con la estabilidad de la cromatina espermática y la eficiencia reproductiva en los ovinos en estudio, usando métodos para calcularlas dados por Foote, en Cerna et al., 1995, el cual sugiere sobre las respuestas reproductivas y los métodos para calcularlas; las mismas que deben expresarse como promedio, porcentaje o proporción de una variable particular, genotipo, edad, raza, estación del año, período del tiempo y condición experimental.

Respecto a la correlación de Pearson para la tasa de preñez y la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides esta da negativa (-0.11), donde no hay significancia estadística siendo $P > 0.05$.

Es posible sugerir que a mayor grado de descondensación de la cromatina la tasa de parición permanece. La dispersión de los grados de compactación tienden a incrementar el porcentaje de parición, así, el punto "66.67" (66.67, 0.99), el punto "80" (80, 0.93) y

el punto “86.67” (86.67, 0.89), de donde se desprende que al aumentar el porcentaje de pariciones tiende a disminuir el grado de compactación, de 0.99 a 0.82. De acuerdo al gráfico A.6 del Anexo.

Cuadro 11:

Número de borregas al empadre, servidas y preñadas
por carnero y porcentaje de servidas

Nº arete de carnero	Nº de borregas al empadre	Nº de borregas servidas	Nº de borregas paridas	Porcentajes de servidas
750 (1)	15	12	10	80.00
745 (2)	15	14	13	93.30
729 (3)	15	13	12	86.67
755 (4)	15	13	11	86.67
747 (5)	15	12	10	80.00
Total	75	64	56	

() Las cifras que sustentan este cuadro se hallan en anexos (A.8 – A.12).

En el cuadro 12, de contingencia, se evalúan a los 5 carneros que han preñado o no a las borregas, no encontrándose diferencias significativas entre los animales, es decir, ninguno sobresalió sobre el otro en ser más eficaz en la reproducción.

Cuadro 12:

Carneros que preñaron y no preñaron a las borregas

Preñez	Estadísticos	Animales					Total
		750	745	729	755	747	750
Preño	Recuento % del total	10 13.3%	13 17.3%	12 16.0%	11 14.7%	10 13.3%	56 74.7%
No preño	Recuento % del total	5 6.7%	2 2.7%	3 4.0%	4 5.3%	5 6.7%	19 25.3%
Total	Recuento % del total	15 20,00%	15 20,00%	15 20,00%	15 20,00%	15 20,00%	75 100,00%

$$c_c^2 1,491 \leq c_{tab(0.05; 4 g.l)}^2 9,488 \text{ NS}$$

V. Discusión

La diferencia de los grados de compactación entre los machos estudiados depende del efecto del periodo o mes que se obtuvieron los eyaculados (interacción compactación * mes: significativo) lo que sugiere la presencia del efecto estacional en el proceso de la Espermatogénesis sobre la compactación de la cromatina nuclear (Parvinen, 1982). No obstante que los carneros no son mayormente susceptibles al efecto de la estacionalidad (Turek y Van Cauter, 1994), lo cual se observa en las características seminales (concentración, morfología y motilidad) no fueron alterados, sin embargo si existe un efecto sobre los grados de compactación de la cromatina. Según su interacción con la variable técnicas, el mayor porcentaje ocurrió entre los grados 0 y 1, que expresa una apropiada estabilidad de la cromatina, la cual sugiere la calidad de espermatozoides con buen potencial fecundante (Bedford, 1982). La mayor estabilidad se encontró con la técnica BB con un mayor porcentaje de espermatozoides con grado 0 en todos los carneros, es refrendada por la buena calidad de línea de estos reproductores que garantiza su capacidad fertilizante (Gamarra y Villarroel, 1978); sin embargo la interacción con las técnicas (medios de cultivo), sugiere que este grado de compactación (0) fue más manifiesto en un medio como el BB, que en los otros (SDS y EDTA). Esto podría deberse a que el Sodio Dodecil sulfato es un detergente que actúa sobre los puentes disulfuro de la cromatina, lo que hace menos estable la cromatina del espermatozoide al ser sometido al detergente SDS. En cuanto al EDTA es un agente quelante que actúa sobre el zinc eliminándolo; este mineral les da estabilidad a los puentes disulfuro de la cromatina espermática (Bedford y col., 1973).

Respecto a la estructura y fisiología de membrana de los espermatozoides, estas variables han mostrado ser bastante consistentes en las tablas de contingencia para la estructura de membrana, donde eosina evidencia una diferencia entre las células que si responden a la prueba de membrana; mientras que para hipo osmótico es más significativo pues las poblaciones de espermatozoides de los animales muestran mayor diferencia entre las células hinchadas y no hinchadas, es decir, la fisiología y la estructura de los eyaculados está evidenciando estar en condiciones óptimas para

que las poblaciones de espermatozoides cumplan con su papel de fecundar al gameto femenino.

La confiabilidad de los resultados de las pruebas son soportadas por la correlación de estas en la medición de una asociación con una misma tendencia.

En lo que respecta a la tasa de preñez y su relación con la estabilidad de la cromatina, se tiene que los grados de compactación de cada población espermática tienen un rango de acuerdo a los promedios obtenidos para cada técnica, dando una relación no significativa, lo que sugeriría que no hay un grado adecuado para la buena estabilidad de la cromatina, que no coincidió con ser el de mayor frecuencia en la preñez.

Se requería de un análisis de semen standard, que incluye concentración, morfología y motilidad, el cual es muy usado como indicador de la fertilidad (Liu y Baker, 1992), lo que influiría sobre los aspectos fisiológicos, estructurales y estabilidad de la cromatina de los espermatozoides. Se utilizó un método que nos permitiese obtener espermatozoides de la mejor calidad (en términos de morfología y motilidad) y con la menor contaminación posible de otras estructuras celulares o no celulares como granulaciones y cristales (Pérez y Pérez, 1985).

El eyaculado de óvidos y cápridos, lo mismo que el de los rumiantes en general, esta integrado por cuatro fracciones o emisiones líquidas, producto de las glándulas de Littre, bulbouretrales, próstata, ampollas de Henle y glándulas vesiculares. El mayor volumen corresponde a las glándulas próstata y ampollas de Henle; de aquí que, en función de este fenómeno biológico, podamos admitir que el eyaculado de ovinos y caprinos sea de escaso volumen y alta concentración espermática, ya que en todas las especies el volumen del eyaculado depende de la capacidad secretora de las glándulas paragenitales. (Perez – Pérez, 1985).

Son importantes los aspectos de apreciación morfológica y cinética de los espermatozoides. De aquí que la contrastación microscópica del eyaculado comprende, en primer lugar, la observación de su capacidad motora en su manifestación de conjunto “motilidad masal e individual” de los espermatozoides. Es necesario trabajar con platina calentable (termostática), dada la influencia que tiene la temperatura sobre la motilidad de los espermatozoides, llegando a establecerse el shock térmico en circunstancias extremas. La motilidad masal del eyaculado debe apreciarse lo antes posible después de la obtención del esperma (Perez – Pérez, 1985).

Para evitar el shock térmico se usó también una platina calentable adaptable a la base del microscopio que se pudo graduar con un dispositivo mecánico.

La presión osmótica tiene gran importancia, no en el propio eyaculado, cuyas variaciones no sobrepasan los límites normales, sino por lo que se refiere a la composición de los diluyentes. En términos generales, se puede admitir que los espermias requieren para su normal mantenimiento medios isotónicos. Las variaciones en la presión osmótica de los disolventes o medios de cultivo no son compatibles con la vitalidad espermática. Sin embargo, se han ensayado medios diferentes ligeramente hipotónicos, con la idea de que ello significa mayores posibilidades de desintoxicación natural de la célula espermática, fenómeno que favorecería la supervivencia y la capacidad fecundante de los espermios. Parece ser que los espermios de los rumiantes son los más resistentes a la presión osmótica, mientras que los gametos de animales de fecundación interna exigen para su normal biología escasísimas variaciones de la misma. (Perez y Pérez, 1985).

En nuestro caso se usó la prueba hipoosmótica para probar la eficiencia funcional de la membrana espermática, como está descrito en la metodología de la mencionada prueba, la cual nos da un porcentaje aceptable en la población de espermatozoides sometida a condiciones de hipoósmosis es la que indicaría que existe un potencial fértil adecuado para que éstos sean considerados con una funcionalidad óptima de su membrana espermática, de esta manera puedan efectuar el trabajo para el que han sido creadas.

La obtención de altos porcentajes de células espermáticas que fueron sometidas a la prueba hipoosmótica nos sugieren que las poblaciones espermáticas sometidas a pruebas de integridad de membrana (eosina y prueba hipoosmótica), son cruciales para la viabilidad y los cambios fisiológicos que ocurren en la superficie de membrana (Liu y Baker, 1992), por lo que se puede afirmar que ambas pruebas tendrían un valor para probar la fertilidad de los espermatozoides, dando respuesta al objetivo planteado.

La integridad de membrana es importante para el metabolismo espermático, la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la unión del espermatozoide a la superficie del ovocito. Un daño de la integridad de membrana puede causar la pérdida de la función normal del espermatozoide, como la motilidad, la viabilidad y la capacidad fecundante de este. Una propiedad de la membrana espermática es su habilidad de permitir el transporte selectivo de las moléculas. Se ha demostrado que

la exposición de espermatozoides de mamíferos a condiciones hipoosmóticas puede causar un flujo de agua a través de la membrana, lo que resulta en un aumento del volumen espermático e hinchamiento de la membrana plasmática. La capacidad de la cola espermática para hincharse en presencia de una solución hipoosmótica es una señal de que el transporte de agua a través de la membrana ocurre con normalidad (Song et al, 1991).

El hinchamiento del núcleo espermático y la descondensación de la cromatina en espermatozoides de mamíferos ocurren poco después de la penetración del espermatozoide al citoplasma del ovocito. Se duplicó la descondensación de la cromatina al incubarse *in vitro* los pre eyaculados de carnero y bovino. Hubo un incremento en el tiempo de descondensación al ser almacenados *in vitro* a 25 °C, lo cual reflejó un aumento en las uniones dentro de los espermias por las histonas para la formación de puentes disulfuro, esto puede aumentar la mortalidad embrionaria, cuando se observa que los espermatozoides son almacenados *in vitro* antes de la inseminación (Beil y Graves, 1977).

Los resultados obtenidos respecto a la oportuna descondensación de la cromatina al ser incubados en buffer borato como principal y común medio a los tres grados de condensación a una temperatura de 40°C por 45 minutos aproximadamente, de ninguna manera se asemeja a ser almacenado por algunos horas o días, pero nos dice de lo importante que es la variación de la temperatura para el caso de programas de inseminación artificial y las consideraciones que debe haber para la obtención de buenos resultados, es decir, altos porcentajes de preñez y viabilidad de los embriones.

Durante el estadio tardío de la espermiogénesis, el núcleo de la espermátida se vuelve muy condensado y adopta una forma elongada característica de la especie. Aunque no se tiene una comprensión total de las fuerzas que determinan la forma del núcleo, se sabe que estas modificaciones visibles están acompañadas de cambios bioquímicos que implican la eliminación del ARN del núcleo al inicio de la elongación nuclear y el reemplazo de la histona rica en lisina por una proteína más básica rica en arginina. (Bedford et al, 1973).

Espermatozoides obtenidos de los testículos, epidídimos y eyaculados de ovinos saludables, durante las estaciones reproductivas y no reproductivas, fueron inducidas a descondensación de la cromatina con ditiotritol (DTT) y sodio dodecil sulfato (SDS) *in vitro*. Un alto rango de núcleos estables no descondensados (79%) se observó en semen de carnero con fertilidad normal. Cambios contrarios se observaron en el

semen de carneros con baja fertilidad, mostrando 31% de estabilidad de la cromatina. No se encontraron diferencias entre los espermátogramas de estos dos grupos. Es posible que el papel del plasma seminal y algunos de sus constituyentes (Zinc) sobre la descondensación de la cromatina en espermios de carnero, pueda inhibir por completo la descondensación, mientras que lo contrario se observó al adicionar el agente quelante EDTA al semen recolectado. Los resultados sugieren que la inducción de la descondensación de la cromatina con SDS, bajo condiciones controladas puede ser un método confiable para predecir la capacidad fértil de una muestra de semen de carnero (Rodríguez et al, 1985).

Podemos decir que los resultados del autor se asemejan a los que se han obtenido en el presente trabajo respecto a la acción de las técnicas usadas, pues al añadir el agente quelante EDTA, que elimina al zinc, al buffer borato y cultivar en el medio por casi una hora a los espermatozoides, se notó que no existía inhibición de la descondensación de la cromatina, como al parecer si sucede en los tubos con BB y SDS. Cabe mencionar que los procedimientos en el uso de las técnicas del presente estudio son diferentes a lo realizado por el referido autor.

Se sabe que la protamina P1 la tienen el toro, **carnero**, rata, cerdo y cuy (guinea pig); los humanos tienen una más el P2. Esto hace menos estable la cromatina en humanos que en el resto de especies (Evenson et al, 2002). Estos resultados coinciden de alguna manera con los nuestros en el sentido que los espermatozoides sometidos al EDTA no tienen una forma muy descondensada, lo que no quiere decir que no haya habido descondensación, sólo que es muy poco notoria, tal vez debido a la presencia de la protamina P1, que hace más estable la cromatina de los ovinos.

La cromatina del espermatozoide de mamíferos sufre un proceso de compactación durante su diferenciación en los testículos. La cromatina compactada adquiere estabilidad durante el paso del espermatozoide por el epidídimo. Se ha establecido que la estabilidad es adquirida debido a la presencia del zinc, el cual estabiliza los puentes disulfuro creados por la unión de los radicales tiol de las cisteínas del ADN, y también de los puentes disulfuro de las protaminas de la cromatina espermática. Los espermatozoides expelidos al eyaculado en el líquido seminal entran en contacto con las secreciones del fluido prostático el cual tiene altas concentraciones de zinc, y a su vez con el fluido vesicular el cual contiene ligandos de zinc de alto peso molecular (Andrews et al, 1994).

Los puentes disulfuro son hidrolizados por acción del agente quelante EDTA que actúa sobre el zinc el cual estabiliza los puentes disulfuro.

La tasa de fecundación en relación a la condensación de la cromatina, que fue visualizada con azul de anilina, fue de 81.7% en el grupo 1 y de 65.9% en el grupo 2. La tasa de preñez disminuyó significativamente de 33.9% en el grupo 1 a 9.1% en el grupo 2 (Hammadeh, et al., 1998). Estos resultados, si bien corresponden a humanos, nos dan una idea de que la condensación de la cromatina en mamíferos tiende a variar, pues en nuestro estudio la tasa de preñez en borregas Junín (86 %), si bien es cierto no hay grado de condensación que se diferencie del otro con respecto a la preñez, lo que se fundamenta en que ningún carnero es mas eficaz en la reproducción que el otro al verse el cuadro de los que preñaron y no preñaron. Los grados de condensación de la cromatina 1 y 2 son los menos estables, en comparación al grado cero que es el más estable.

Cambios en la ingesta de alimentos afecta el eje reproductivo (hipotálamo – hipófisis - gónadas), las señales nutricionales implicadas y los sitios que las reciben se conocen ahora. Los estudios en ovejas machos maduros, son un modelo en el que altos consumos de alimentos estimula la frecuencia del pulso GnRH - LH de 10 a 20 días y continúa promoviendo el crecimiento testicular algunos meses después (Blache et al., 2000). La alta prolificidad de los carneros sugiere al efecto Flushing, en esta especie hay un efecto significativo por alimentación, especialmente antes del empadre, presentándose un incremento de partos mellizos.

La estructura de la cromatina espermática y la estabilidad del ADN con relación al potencial fértil han sido ampliamente estudiadas, en los últimos 20 años. Varias pruebas que evalúan diferentes aspectos de la estructura de la cromatina y la integridad de membrana de células espermáticas que usan interacciones específicas y complejas entre compuestos y el ADN se han desarrollado a lo largo de estos años. Estos incluyen pruebas que usan fluorocromos con una interacción específica con la cromatina y el ADN e identifican tenues defectos en el ADN y la integridad de la cromatina, estas pruebas pueden identificar espermatozoides no viables y dar un umbral predictivo del potencial fértil del individuo de la especie en estudio, incluyen la prueba de electroforesis en gel del ADN desnudo (COMET), la prueba de nucleótidos marcados UTP mediada por la transferasa deoxinucleotidil (TUNEL), la prueba de un trozo de ADN marcado con fluorocromo (ISNT), la prueba de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) y la prueba de naranja de acridina (AOT) (Boe- Hansen et al, 2005).

Estas pruebas son de última generación y tienen reactivos e instrumentos que no han sido usados en el presente estudio. Es posible afirmar que todas las pruebas pueden ser posibles de usarse en cualquier especie de mamíferos (Cortes – Gutiérrez, et al., 2007, García – Macias, et al., 2006). Nuestro aporte puede ser el dar a conocer una prueba de menor costo que las mencionadas por otros autores, para el estudio de las fuentes de recursos genéticos que es necesario conservar en el Perú.

VI. Conclusiones

1. La correlación entre el análisis funcional y estructural de las membranas de las poblaciones de espermatozoides, y los grados de compactación o descondensación de la cromatina por otro lado, sugerirían que existe una asociación entre las propiedades tanto de la membrana espermática como de la estabilidad de la cromatina, lo que podría proyectar una idea del potencial fértil de la población de espermatozoides estudiados.
2. Las tasas de preñez y el número de borregas servidas por los carneros Junín, sugerirían que estos estarían en buenas condiciones reproductivas, lo cual podría ser evidenciado por los índices obtenidos.

VII. Referencias Bibliogràfiques

1. **Andrews, J.C; J.P Nolan; R.H Hammerstedt and B.D Bavister** (1994) Role of Zinc during Hamster sperm capacitation *Biol Reprod* 51: 1238-1247
2. **Baarends, W; R. van der Laan and J.A Grootegoed** (2001) DNA repair mechanisms and gametogenesis *Reproduction* 121: 31 – 39
3. **Ballachey, B.E; W.D Hohenboken and D.P Evenson** (1987) Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility *Biol Reprod* 36: 915-925
4. **Ballachey, B; D. Evenson and R. Saacke** (1988) The sperm chromatin structure assay Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls *J Androl* 9: 109-115
5. **Blache, D; L.M Chagas; M.A Blackberry; P.E Vercoe and G.B Martin** (2000) Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep *J Reprod Fert* 120, 1 – 11.
6. **Bedford, J** (1982) Fertilization *Reproduction in mammals* Austin C , Short R eds. Vol 1, second edition Cambridge University
7. **Bedford, J; M. Bent and H. Calvin** (1973) Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morfologically normal human spermatozoa *J Reprod Fert* 33: 19-29
8. **Beil, R.E and C.N Graves** (1977) Nuclear decondensation of mammalian spermatozoa: changes during maturation and in vitro storage *J Exp Zool* Nov; 202 (2): 235 – 240
9. **Blazak, W and J. Overstreet** (1982) Instability of nuclear chromatin in the ejaculated spermatozoa of fertile men *J Reprod Fert* 65: 331-339

10. **Boe-Hansen, G.B; A.K Ersboll and P. Christensen** (2005) Variability and laboratory affecting the sperm chromatin structure assay in human sperm *J Androl* vol.26 N° 3 may/ june pag. 360 – 368
11. **Cerna Cabrera, C; T.E Deza y G.B Lluén** (1995) Reproducción de los animales domésticos CONCYTEC – Serie Ciencias
12. **Clemmons, A; D. Thompson and L. Johnson** (1995) Local initiation of spermatogenesis in the horse *Biol Reprod* 52: 1258-1267
13. **Cortés – Gutierrez, E; M. Dávila – Rodríguez; C. López- Fernández; J. Fernández y J. Gosálvez** (2007) Evaluación del daño en el DNA espermático *Actas Urológicas Españolas* 120 – 131 Febrero
14. **Cueto, M.; J. García Vinent; A. Gibbons; M. Wolff y J. Arrigo** (1993). Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche N° 200.
15. **Darszon, A; P. Labarca; T. Nishigaki and F. Espinosa** (1999) Ion channels in sperm physiology *Physiol Rev* 79: 481 – 510
16. **Evans, G. y W. Maxwell** (1987). Salomon' s artificial insemination of sheep and goats. London: Butterworth, 192 p
17. **Evenson, D.P.; K.L. Larson and L.K. Jost** (2002) Sperm Chromatin Structure Assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in Male infertility and comparisons with other techniques *Journal of Andrology* Vol. 23, N° 1 Jan / Feb Pag. 25 – 43
18. **Ferrari, M.R.; S.E Spirito; S.M Giuliano and H.A Fernández** (1998) Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa *Andrologia* 30, 85 – 89
19. **Gamarra, R. y C. Villarroel** (1978). El ovino tipo Junín. Sociedad Agrícola de Interés Social SAIS Túpac Amaru Ltda. N° 1, Pachacayo, Perú. Pag. 36.
20. **García-Macías, V; F. Martínez-Pastor; M. Álvarez; S. Borrigan; C. Chamorro; A. Soler; L. Anel and P. De Paz** (2006) Seasonal changes in sperm chromatin condensation in ram (*Ovis aries*), Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and Brown bear (*Ursus arctos*) *Journal of Andrology* Vol. 27, N° 6 Nov / Dec

21. **González, G.F.** (1992) Andrología fertilidad e infertilidad Programa de Reproducción Humana Organización Mundial De la Salud IIA –UPCH. Pag.295 –298
22. **Graham, J; R. Roote and S. Hough** (1987) Penetration of zona free hamster eggs by liposoma-treated sperm from the bull, ram, stallion and boar *Biol Reprod* 37: 181-188.
23. **Hafez, E.S.E. y B. Hafez** (2002) Reproducción e inseminación artificial en animales Séptima edición Mc Graw- Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
24. **Hammadeh, M; M. Stieber; Haidl and Schmidt** (1998) Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program *Andrologia* 30: 29-35
25. **Hinrichsen, M and J. Blaquier** (1980) Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis *J Reprod Fert* 60: 291-294
26. **Hötzel, M.J; C.M Markey; S.W Walkden – Brown; M.A Blackberry and G.B Martin** (1998) Morphometric and endocrine analyses of the effects of nutrition on the testis of mature Merino rams *J Reprod Fert* 113, 217 – 230.
27. **Jeyendran, R.S.; H.H. Van der Ven; M. Perez – Pelaez; B.G. Crabo and L.J.D Zaneveld,** (1984) Development of assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics *J. Reprod. Fert.* 70, 219 – 228
28. **Kjellberg, S; L. Bjorndahl and U. Kvist** (1992) Sperm chromatin stability and zinc binding properties from men in barren unions *Int J Androl* 15: 103-113
29. **Kuehl, Robert O.** (2001) Diseño de Experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación 2ª edición International Thomson editores, S.A de C.V. Impreso en México
30. **Kvist, U; L. Bjorndahl and S. Kjellberg** (1987) Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility *Scanning Microsc* Sep 1 (3): 1241 – 1247
31. **Kvist, U; S. Kjellberg ; L. Bjorndahl ; M. Hammar and G.M Roomans** (1988) Zinc in sperm chromatin and chromatin stability in fertile men and men in barren unions *Scand J Urol Nephrol* 22 (1) : 1 – 6

- 32. Liu, D.Y and H.W Baker** (1992) Tests of human sperm function and fertilization in vitro *Fertility and Sterility* Vol. 58 No. 3 September 465 – 483
- 33. Love, Ch and R. Kenney** (1994) Relationship of sperm chromatin to fertility in the stallion. 40th Annual Convention Proceedings. American Association of equine practitioners
- 34. Mc Carthy, S ; W.S Ward** (2000) Interaction of exogenous DNA with the nuclear matrix of live spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 56: 235 – 237
- 35. Magistrini, M; M. Vidament; F. Clement and E. Palmer** (1996) Fertility prediction in stallions *Anim Reprod Sci* 42: 181-188
- 36. Milton, J. Susan** (1994) Estadística para Biología y Ciencias de la Salud Mc Graw - Hill Interamericana de España 2da. Edición Traducido por Dr. Pere Puig Casado
- 37. Muriel, L; V. Goyanes; E. Segrelles; J. Gosálvez; J. Álvarez and J. Fernández** (2007) Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis *Journal of Andrology* Vol. 28, N° 1 Jan / Feb
- 38. Parvinen, Martti** (1982) Regulation of the seminiferous epithelium *Endocrine Reviews* Vol 3 N° 4 :404 – 417
- 39. Pérez López, César** (2001) El Sistema Estadístico SAS Pearson Educación, S.A., Madrid, España.
- 40. Perez y Perez, Félix** (1985) Reproducción animal Editorial Científica Médica Barcelona España
- 41. Rodríguez, H; C. Ohanian and E. Bustos-Obregón** (1985) Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen *Int J Androl* Apr 8 (2): 147 – 158
- 42. Royere, D; S. Hamamah; J. Nicolle and J. Lansac** (1991) Chromatin alterations induced by freeze – thawing influence the fertilizing ability of human sperm *Int J Androl* (14): 328 – 332

43. **Seligman, J and R. Shalgi**, (1991) Protein thiols in spermatozoa and epididymal fluid of rats *J Reprod Fert* 93, 399 – 408.
44. **Seligman, J; N.S Kosöwer; R. Weissenberg and R. Shalgi** (1994) Thiol – disulfide status of human sperm proteins *J Reprod Fert* 101, 435 – 443.
45. **Song, BL; Peng DR; H.Y Li; G.H Zhang; J. Zhang; L. Li and Y.Q Zhao** (1991) Evaluation of the effect of butyl *p*- hydroxibenzoate on the proteolytic activity and membrane function of human spermatozoa *J Reprod Fert* 91, 435 – 440.
46. **Turek, F and E. Van Cauter** (1994) Rhythms in reproduction *The Physiology of Reproduction* 2nd edition Knobil and Neill, eds Raven Press, Ltd. New York pp 1789-1824 Chapter 42
47. **Ward, W and D. Coffey** (1989) Identification of a sperm nuclear annulus: A sperm DNA anchor *Biol Reprod* 41: 361-370
48. **Williams, R; J. Graham and R. Hammerstedt** (1991) Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova *Biol Reprod* 44: 1080-1091
49. **Ward, WS and D.S Coffey** (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells *Biol Reprod* 44: 569 –574
50. **Wassarman, Paul M** (1987) The biology and chemistry of fertilization *Science* Vol 235: 553 - 560 30 Jan
51. **Yanagimachi, R** (1981) Mechanisms of fertilization in mammals Chapter 5 Mastroniani, L ; Biggers, JD eds *Fertilization and embryonic development* New York Plenum Press
52. **Zhang, X; M. San Gabriel and A. Zini** (2006) Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: Evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate *Journal of Andrology* Vol. 27, N° 3 May / June

VIII. Anexos

A.1 Primer Muestreo de semen de ovino 21 febrero 2005. A los cinco ovinos.

745

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	55	10	10
1	25	50	40
2	20	40	50

729

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	45	10	05
1	35	60	55
2	20	30	45

747

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	40	25
1	30	50	45
2	10	10	30

750

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	50	10	15
1	40	30	20
2	10	60	65

755

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	50	30
1	30	40	45
2	10	10	25

A.2. Segundo Muestreo de semen de ovino 12 de marzo de 2005. A los cinco ovinos

745

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	65	35
1	35	25	30
2	05	10	25

729

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	65	20
1	40	25	40
2	0	10	35

747

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	05	15
1	30	55	40
2	10	40	45

750

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	45	05	15
1	50	60	45
2	05	35	40

755

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	40	05	05
1	50	45	40
2	10	50	55

A.3. Tercer Muestreo de semen de ovino 16 de abril de 2005. A los cinco ovinos.

745

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	60	15
1	40	30	50
2	0	10	35

729

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	30	20
1	30	50	40
2	20	20	30

747

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	55	45	25
1	35	30	40
2	10	25	35

750

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	30	10
1	25	50	55
2	15	20	35

755

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	60	40
1	40	40	40
2	0	0	20

A.4 Cuarto Muestreo de semen de ovino 14 de mayo de 2005. A los cinco ovinos.

745

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	55	10	20
1	25	50	40
2	20	40	40

729

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	45	10	10
1	35	60	50
2	20	30	40

747

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	40	35
1	30	50	40
2	10	10	25

750

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	50	10	15
1	40	30	25
2	10	60	60

755

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	50	40
1	30	40	25
2	10	10	35

A.5 Quinto Muestreo de semen de ovino 04 de junio de 2005. A los cinco ovinos.

745

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	10	20
1	30	50	35
2	10	40	45

729

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	45	30	25
1	30	50	40
2	25	20	35

747

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	15	10
1	30	55	50
2	10	30	40

750

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	65	35
1	30	20	40
2	10	15	25

755

Grad. Comp \ Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0	60	10	10
1	40	60	50
2	0	30	40

A. 6 Cuadrados medios esperados para el análisis de varianza de parcelas divididas

Fuente de variación	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Cuadrado medio esperado
Bloques (Plot Mayor) Animales	$r - 1$	CM bloques	
A (Meses)	$a - 1$	CM A	$\sigma_e^2 + b(d2 + rb(a2$
Error (1)	$(a - 1)(r - 1)$	CME (1)	$(e2 + b(d2$
B (Sub Plot Menor)	$b - 1$	CM B	$(e2 + a(g2 + ra(b^2$
Error (2)	$(b - 1)(r - 1)$	CME (2)	$\sigma_e^2 + a\sigma_g^2$
AB (Interacción)	$(a - 1)(b - 1)$	CM (AB)	$\sigma_e^2 + r\theta_{ab}^2$
Error (3)	$(a - 1)(r - 1)(b - 1)$	CME (3)	σ_e^2

A.7 N° de Borregas con empadre con machos y pechera de colores

N° Arete	Color Arete	Color Pechera	Color hembra empadre	# borregas empadre
745	Rojo	Rojo	Rojo	12
729	Negro	Azul	Azul	14
747	Verde	Verde lechuga	Amarillo	13
750	Azul	Verde	Verde	13
755	Amarillo	Negro	Marrón+blanco	12

A.8 RESULTADOS DE LOS EMPADRES DE OVINOS CON BORREGAS IVITA HYO

Nº Carnero	Borrega N°	Edad	Fecha Parto	PV cría	Sexo
750	501	3.0	05/02/06	3.0	1
750	502	2.6			
750	503	2.7	07/02/06	4.0	1
750	504	2.6	08/02/06	3.5	1
750	505	3.1	05/02/06	3.0	2
750	506	3.0			
750	507	3.2			
750	508	2.9	06/02/06	3.6	1
750	509	2.8	10/02/06	3.8	1+
750	510	3.0	08/02/06	3.3	2
750	511	2.5	15/02/06	3.9	2
750	512	3.0			
750	513	2.7	17/02/06	3.6	2
750	514	2.7			
750	515	2.6	10/02/06	3.7	2
TOTAL					10

% Borregas servidas = $[12/15] \times 100 = 80\%$

% Borregas q' parieron = $[10/15] \times 100 = 66.67\%$

% Nacidos vivos = $[9/10] \times 100 = 90\%$

Proporción de sexos = $[5/10] \times 100 = 50\%$ machos y 50% hembras.

A.09 RESULTADOS DE LOS EMPADRES DE OVINOS CON BORREGAS IVITA HYO

N° Carnero	Borrega N°	Edad	Fecha Parto	PV cría	Sexo
745	601	2.4	01/02/06	2.8	2+
745	602	3.2			
745	603	3.0	17/02/06	3.1	2
745	604	3.5	11/02/06	3.5	1
745	605	3.0	09/02/06	4.0	2
745	606	3.0	09/02/06	3.6	2
745	607	3.2	15/02/06	3.8	1
745	608	2.9	14/02/06	3.7	1+
745	609	2.9	21/02/06	3.2	1
745	610	3.5	20/02/06	3.1	1
745	611	3.0	16/02/06	3.0	2
745	612	3.6	13/02/06	3.5	2+
745	613	3.7	27/02/06	4.0	2
745	614	2.9			
745	615	2.9	20/02/06	3.6	2
TOTAL					13

A.10 RESULTADOS DE LOS EMPADRES DE OVINOS CON BORREGAS IVITA HYO

N° Carnero	Borrega N°	Edad	Fecha Parto	PV cría	Sexo
729	701	2.6	01/03/06	2.9	2+
729	702	2.8	25/02/06	3.6	2
729	703	2.9	24/02/06	3.5	1
729	704	2.8			
729	705	3.0	10/02/06	3.4	1
729	706	3.0	12/02/06	3.3	2
729	707	3.5	26/02/06	3.1	1
729	708	2.7			
729	709	2.7	14/02/06	3.0	2
729	710	2.8	10/03/06	3.3	2+
729	711	2.9	21/02/06	2.8	1
729	712	3.1			
729	713	3.2	05/03/06	3.6	2
729	714	3.0	14/02/06	2.9	1
729	715	2.7	17/02/06	3.0	1
TOTAL					12

A.11 RESULTADOS DE LOS EMPADRES DE OVINOS CON BORREGAS IVITA HYO

N° Carnero	Borrega N°	Edad	Fecha Parto	PV cría	Sexo
755	801	3.0			
755	802	3.5	07/02/06	3.7	1
755	803	3.8	10/02/06	3.2	1
755	804	2.6	01/03/06	3.8	1
755	805	2.9			
755	806	3.1	27/02/06	3.3	2
755	807	3.3	20/02/06	3.6	1
755	808	3.4	16/02/06	3.5	2+
755	809	3.0			
755	810	2.9			
755	811	2.7	15/02/06	3.2	2+
755	812	2.6	24/02/06	3.6	2
755	813	3.0	02/03/06	3.1	2
755	814	3.2	26/02/06	3.2	1
755	815	3.1	10/03/06	3.3	1
TOTAL					11

A.12 RESULTADOS DE LOS EMPADRES DE OVINOS CON BORREGAS IVITA HYO

N° Carnero	Borrega N°	Edad	Fecha Parto	PV cría	Sexo
747	901	3.5			
747	902	3.0	15/02/06	3.6	2
747	903	2.9	13/02/06	3.5	2
747	904	2.8	01/03/06	3.6	2
747	905	2.9	10/02/06	3.0	1
747	906	2.7	18/02/06	3.8	1
747	907	2.9	19/02/06	3.6	2
747	908	3.0	20/02/06	3.4	2
747	909	3.1	20/02/06	4.0	1
747	910	3.2	26/02/06	4.5	1
747	911	3.3	25/02/06	3.2	2
747	912	3.0			
747	913	3.0			
747	914	3.2			
747	915	3.1			
TOTAL					10

A.13 Ficha de Evaluación Estructural, Fisiológica y Estabilidad de la Cromatina en espermatozoides de ovinos Junín

Nombre o Código: Ficha N°

Fecha: Edad:

Hora de emisión del eyaculado:

Hora de entrega:

Toma de muestra de semen:

I. ESPERMATOGRAMA

Tiempo de licuefacción Volumen pH

Color Consistencia Aspecto

Aglutinamiento: Si No Otras células

MOTILIDAD

Motilidad Masal (Grados): 0 1 2 3 4 5

Motilidad Progresiva (%): Móviles Inmóviles

CONCENTRACIÓN

Esperm/ ml.

Esperm./ Eyaculado

MORFOLOGÍA

Normales

Anormales

II. INTEGRIDAD DE MEMBRANA

a. I. Estructural (Método de Eosina Y)

Expresar en % :

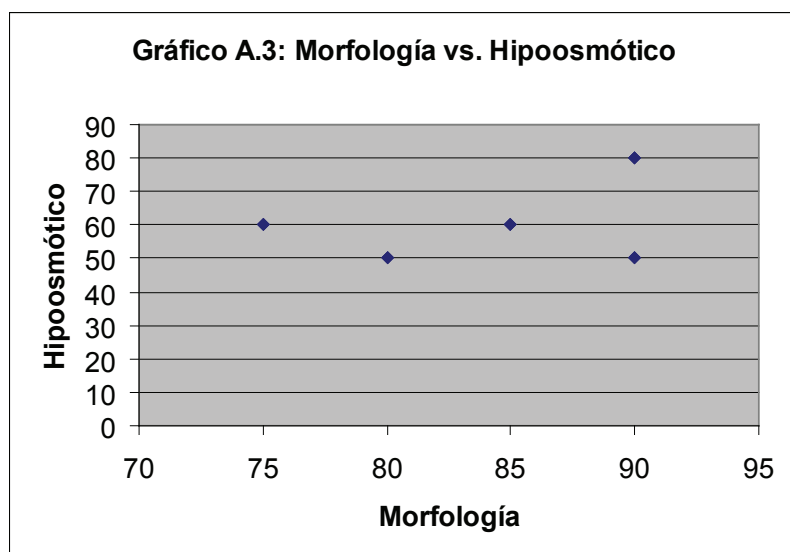
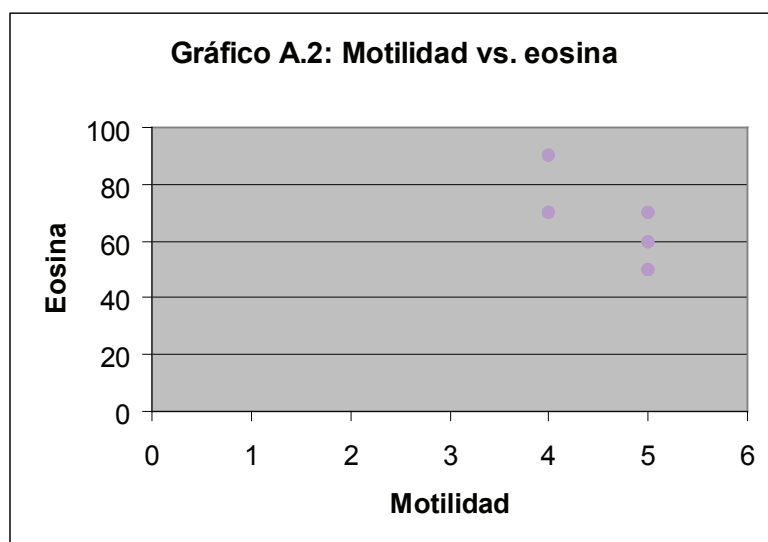
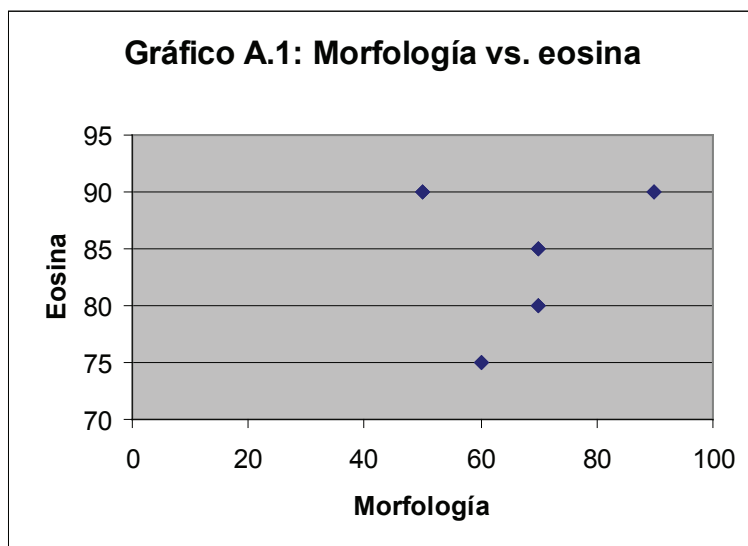
b. I. Fisiológica (Prueba Hipoosmótica)

Expresar en % :

III. GRADOS DE CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA NUCLEAR

Expresar en %:

Grad. Comp \ Reac	Reac	BB (Control)	SDS	EDTA
0				
1				
2				



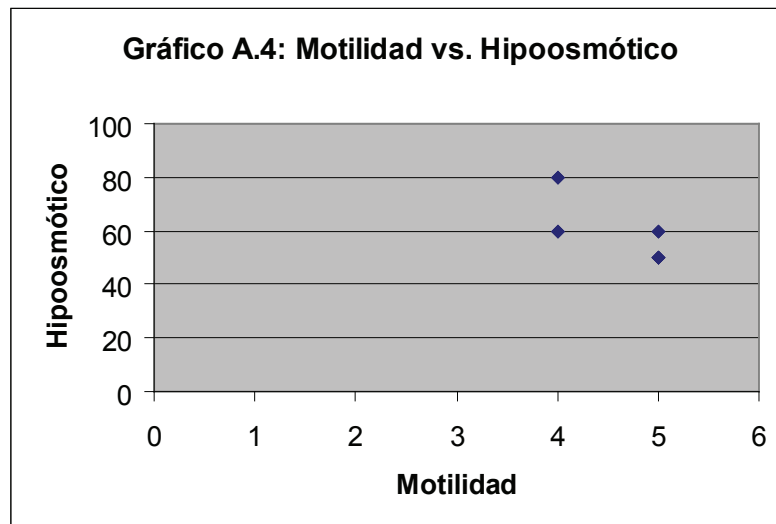
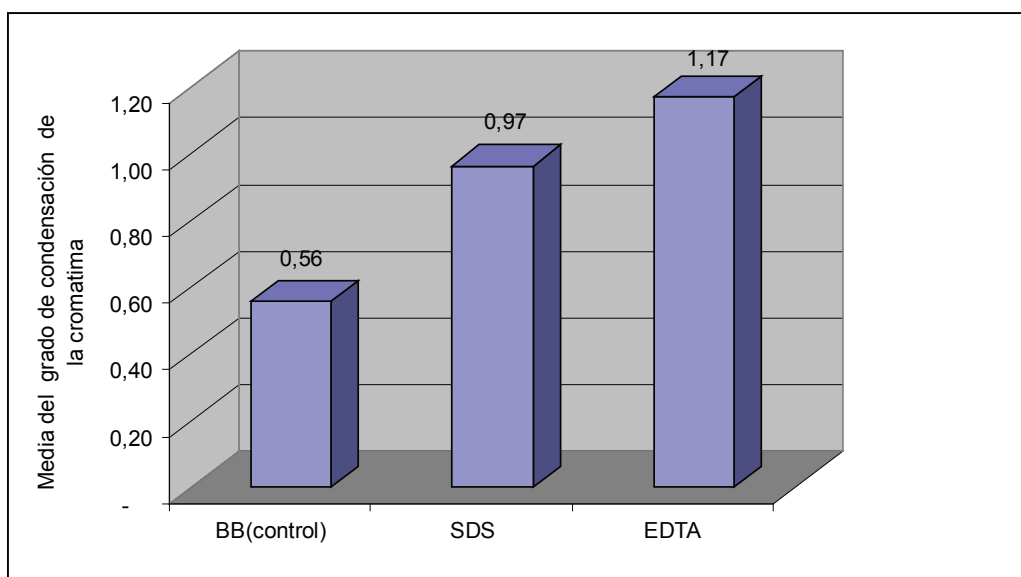


Gráfico A.5: Medida del grado de condensación de la cromatina

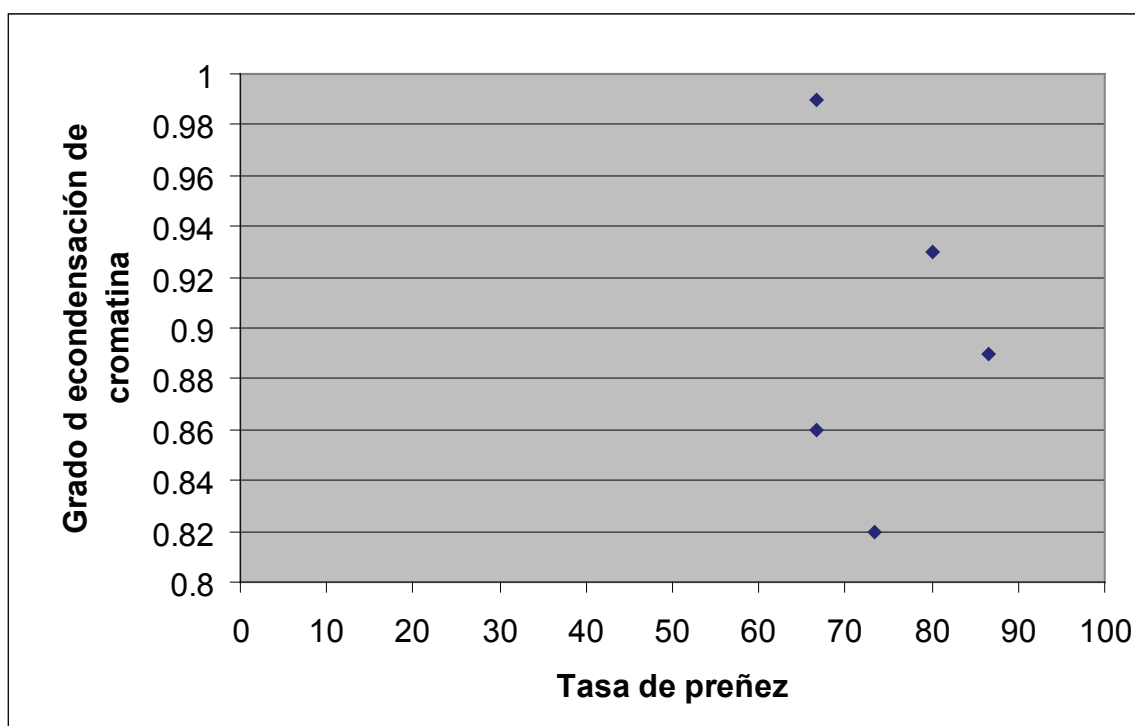


A.14: Correlación entre el grado de condensación de la cromatina y tasa de preñez

	Tasa de preñez
Grado de condensación de la cromatina	-0.11 P=0.85

Se observa que existe una correlación negativa entre (-0.11) entre grado de condensación de la cromatina y Tasa de preñez

Grafico A.6: Dispersión del grado de condensación de la cromatina según tasa de preñez



A.15: Tabla de datos obtenidos y sometidos a evaluación estadística

	Tiempo	Tratamientos	grados	nombre	volumen	concentración	morfo- logía	moti- lidad	eosina	hipoos- mótico	Grado	tasa
1	primer mes	BB(control)	0.65	745	0.4	1800	75	5	60	60	0.89	86.67
2	primer mes	BB(control)	0.75	729	0.7	2050	90	5	50	50	0.93	80
3	primer mes	BB(control)	0.5	747	1.6	1970	85	4	70	60	0.86	66.67
4	primer mes	BB(control)	0.6	750	1	2200	90	4	90	80	0.99	66.67
5	primer mes	BB(control)	0.5	755	1.1	1870	80	5	70	50	0.82	73.33
6	Segundo mes	BB(control)	0.45	745	0.7	2650	70	5	50	65	.	.
7	Segundo mes	BB(control)	0.4	729	1.1	1900	60	5	60	60	.	.
8	Segundo mes	BB(control)	0.5	747	1.5	2100	75	4	60	60	.	.
9	Segundo mes	BB(control)	0.6	750	1.1	2000	60	4	50	50	.	.
10	Segundo mes	BB(control)	0.7	755	1.2	1900	85	5	70	70	.	.
11	tercer mes	BB(control)	0.4	745	0.6	2050	85	4	70	70	.	.
12	tercer mes	BB(control)	0.7	729	0.8	2240	90	4	70	90	.	.
13	tercer mes	BB(control)	0.55	747	1.3	2010	90	5	70	85	.	.
14	tercer mes	BB(control)	0.55	750	1.2	2300	95	5	80	70	.	.
15	tercer mes	BB(control)	0.4	755	0.6	2200	85	3	70	60	.	.
16	cuarto mes	BB(control)	0.65	745	0.3	2320	96	5	90	90	.	.
17	cuarto mes	BB(control)	0.75	729	0.8	2400	90	3	30	20	.	.
18	cuarto mes	BB(control)	0.5	747	1.2	2020	85	4	65	50	.	.
19	cuarto mes	BB(control)	0.6	750	1.1	2280	95	3	90	85	.	.
20	cuarto mes	BB(control)	0.5	755	1	2500	90	5	85	95	.	.
21	quinto mes	BB(control)	0.5	745	1	2700	85	4	60	70	.	.
22	quinto mes	BB(control)	0.8	729	1.1	2400	90	5	80	80	.	.
23	quinto mes	BB(control)	0.5	747	0.8	2450	95	5	75	90	.	.
24	quinto mes	BB(control)	0.5	750	4	2360	95	5	90	80	.	.
25	quinto mes	BB(control)	0.4	755	0.9	1980	95	5	80	85	.	.
26	primer mes	SDS	1.3	745	0.4	1800	75	5	60	60	.	.
27	primer mes	SDS	1.2	729	0.7	2050	90	5	50	50	.	.
28	primer mes	SDS	0.7	747	1.6	1970	85	4	70	60	.	.
29	primer mes	SDS	1.5	750	1	2200	90	4	90	80	.	.
30	primer mes	SDS	0.6	755	1.1	1870	80	5	70	50	.	.
31	Segundo mes	SDS	0.45	745	0.7	2650	70	5	50	65	.	.
32	Segundo mes	SDS	0.45	729	1.1	1900	60	5	60	60	.	.
33	Segundo mes	SDS	1.35	747	1.5	2100	75	4	60	60	.	.
34	Segundo mes	SDS	1.3	750	1.1	2000	60	4	50	50	.	.
35	Segundo mes	SDS	1.45	755	1.2	1900	85	5	70	70	.	.
36	tercer mes	SDS	0.5	745	0.6	2050	85	4	70	70	.	.
37	tercer mes	SDS	0.9	729	0.8	2240	90	4	70	90	.	.
38	tercer mes	SDS	0.8	747	1.3	2010	90	5	70	85	.	.
39	tercer mes	SDS	0.9	750	1.2	2300	95	5	80	70	.	.
40	tercer mes	SDS	0.4	755	0.6	2200	85	3	70	60	.	.
41	cuarto mes	SDS	1.3	745	0.3	2320	96	5	90	90	.	.

42	cuarto mes	SDS	1.2	729	0.8	2400	90	3	30	20	.	.
43	cuarto mes	SDS	0.7	747	1.2	2020	85	4	65	50	.	.
44	cuarto mes	SDS	1.5	750	1.1	2280	95	3	90	85	.	.
45	cuarto mes	SDS	0.6	755	1	2500	90	5	85	95	.	.
46	quinto mes	SDS	1.3	745	1	2700	85	4	60	70	.	.
47	quinto mes	SDS	0.9	729	1.1	2400	90	5	80	80	.	.
48	quinto mes	SDS	1.15	747	0.8	2450	95	5	75	90	.	.
49	quinto mes	SDS	0.5	750	4	2360	95	5	90	80	.	.
50	quinto mes	SDS	1.2	755	0.9	1980	95	5	80	85	.	.
51	primer mes	EDTA	1.4	745	0.4	1800	75	5	60	60	.	.
52	primer mes	EDTA	1.45	729	0.7	2050	90	5	50	50	.	.
53	primer mes	EDTA	1.05	747	1.6	1970	85	4	70	60	.	.
54	primer mes	EDTA	1.5	750	1	2200	90	4	90	80	.	.
55	primer mes	EDTA	0.95	755	1.1	1870	80	5	70	50	.	.
56	Segundo mes	EDTA	0.8	745	0.7	2650	70	5	50	65	.	.
57	Segundo mes	EDTA	1.1	729	1.1	1900	60	5	60	60	.	.
58	Segundo mes	EDTA	1.3	747	1.5	2100	75	4	60	60	.	.
59	Segundo mes	EDTA	1.25	750	1.1	2000	60	4	50	50	.	.
60	Segundo mes	EDTA	1.5	755	1.2	1900	85	5	70	70	.	.
61	tercer mes	EDTA	1.2	745	0.6	2050	85	4	70	70	.	.
62	tercer mes	EDTA	1	729	0.8	2240	90	4	70	90	.	.
63	tercer mes	EDTA	1.1	747	1.3	2010	90	5	70	85	.	.
64	tercer mes	EDTA	1.25	750	1.2	2300	95	5	80	70	.	.
65	tercer mes	EDTA	0.8	755	0.6	2200	85	3	70	60	.	.
66	cuarto mes	EDTA	1.2	745	0.3	2320	96	5	90	90	.	.
67	cuarto mes	EDTA	1.3	729	0.8	2400	90	3	30	20	.	.
68	cuarto mes	EDTA	0.9	747	1.2	2020	85	4	65	50	.	.
69	cuarto mes	EDTA	1.45	750	1.1	2280	95	3	90	85	.	.
70	cuarto mes	EDTA	0.95	755	1	2500	90	5	85	95	.	.
71	quinto mes	EDTA	1.25	745	1	2700	85	4	60	70	.	.
72	quinto mes	EDTA	1.1	729	1.1	2400	90	5	80	80	.	.
73	quinto mes	EDTA	1.3	747	0.8	2450	95	5	75	90	.	.
74	quinto mes	EDTA	0.9	750	4	2360	95	5	90	80	.	.
75	quinto mes	EDTA	1.3	755	0.9	1980	95	5	80	85	.	.

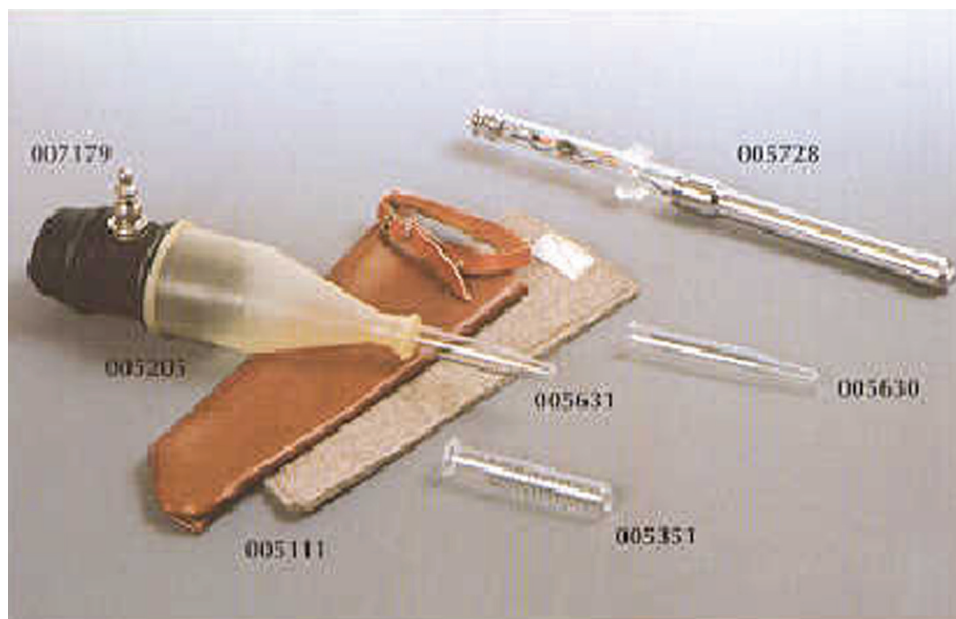
Tabla de Diseño de tres grupos para evaluación de la interacción entre los tratamientos y entre los individuos a través del tiempo

A. 16 Cuadro de los 25 eyaculados con sus grados de compactación

	Ani- males	Meses Técnica <small>Grado</small>	Primer mes	Segundo mes	Tercer mes	Cuarto mes	Quinto mes	Total Promedio
			0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
A	745	BB	55 25 20	60 35 05	60 40 00	55 25 20	60 30 10	58 31 11
		SDS	10 50 40	65 25 10	60 30 10	10 50 40	10 50 40	31 41 28
		EDTA	10 40 50	35 30 25	15 50 35	20 40 40	20 35 45	20 39 39
	729	Meses Técnicas <small>Grado</small>	Primer mes	Segundo mes	Tercer mes	Cuarto mes	Quinto mes	Total Promedio
			0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
		BB	45 35 20	60 40 00	60 30 20	45 35 20	45 30 25	51 34 17
		SDS	10 60 30	65 25 10	60 30 10	10 60 30	30 50 20	35 45 20
	747	EDTA	05 55 45	20 45 35	15 50 35	10 50 40	25 40 35	17 48 38
		Meses Técnicas <small>Grado</small>	Primer mes	Segundo mes	Tercer mes	Cuarto mes	Quinto mes	Total Promedio
			0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
		BB	60 30 10	60 30 10	55 35 10	60 30 10	60 30 10	59 31 10
	750	SDS	40 50 10	05 55 40	45 30 25	40 50 10	15 55 30	29 48 23
		EDTA	25 45 30	15 40 45	25 40 35	35 40 25	10 50 40	22 43 35
		Meses Técnicas <small>Grado</small>	Primer mes	Segundo mes	Tercer mes	Cuarto mes	Quinto mes	Total Promedio
			0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	755	BB	50 40 10	45 50 05	60 25 15	50 40 10	60 30 10	43 37 10
		SDS	10 30 60	05 60 35	30 50 20	10 30 60	65 20 15	24 38 38
		EDTA	15 20 65	15 45 40	10 55 35	15 25 60	35 40 25	18 37 45
		Meses Técnicas <small>Grado</small>	Primer mes	Segundo mes	Tercer mes	Cuarto mes	Quinto mes	Total Promedio
			0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	755	BB	60 30 10	40 50 10	60 40 00	60 30 10	60 40 00	56 38 06
		SDS	50 40 10	05 45 50	60 40 00	50 40 10	10 60 30	35 45 20
		EDTA	30 45 25	05 40 55	40 40 20	25 45 30	10 50 40	22 44 34

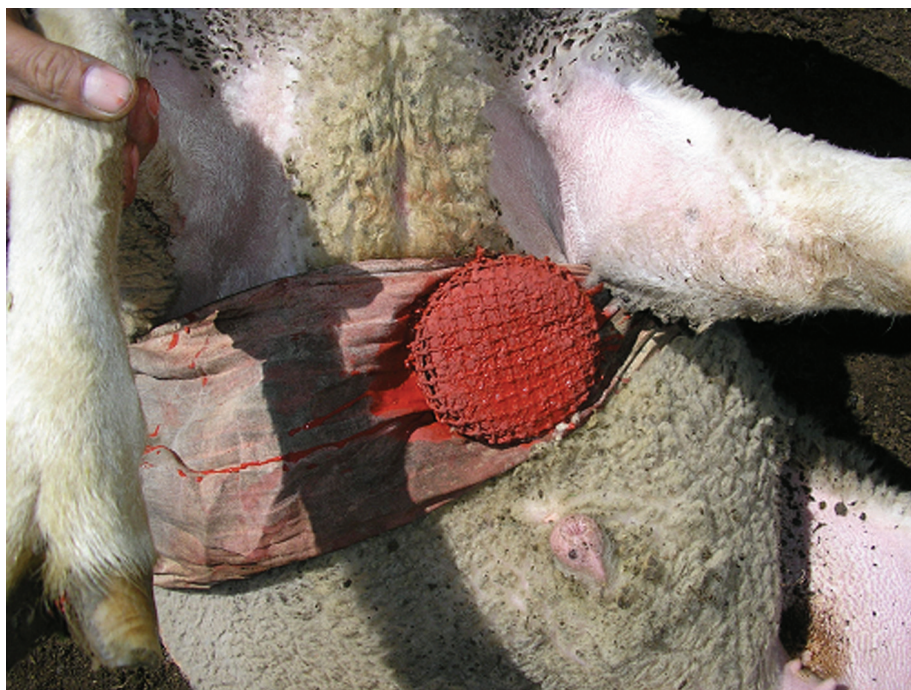


Fotografía N° 1. Ovino macho Junín muestreado





Fotografía N° 2. Borregas Junín pasando por la manga



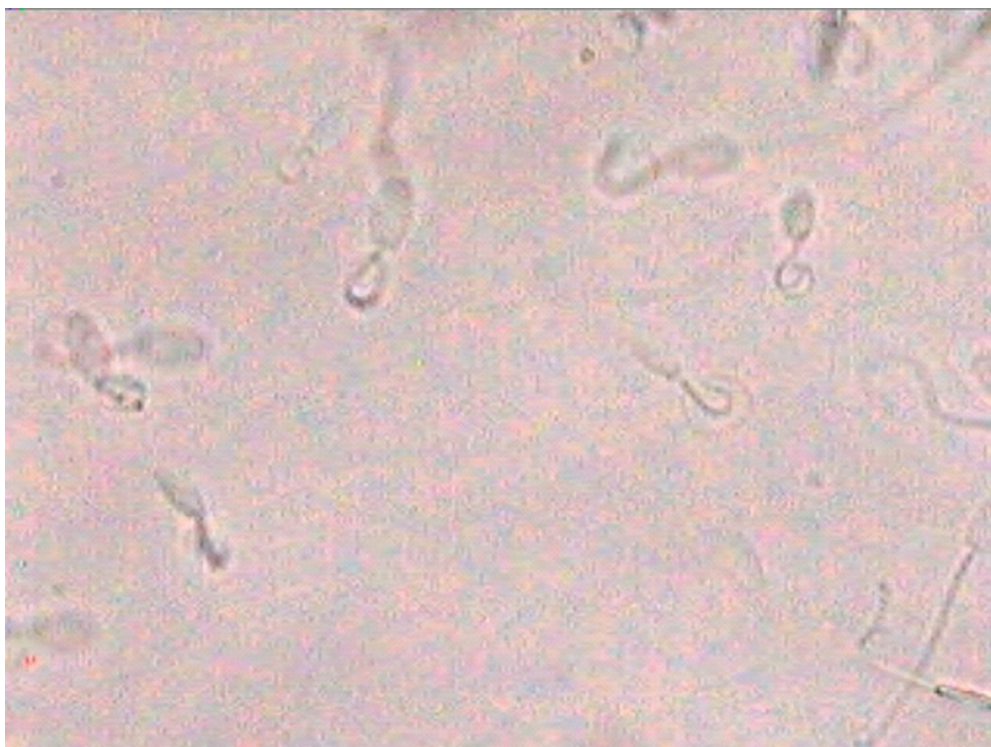
Fotografía N° 3. Ovino macho con pechera roja.



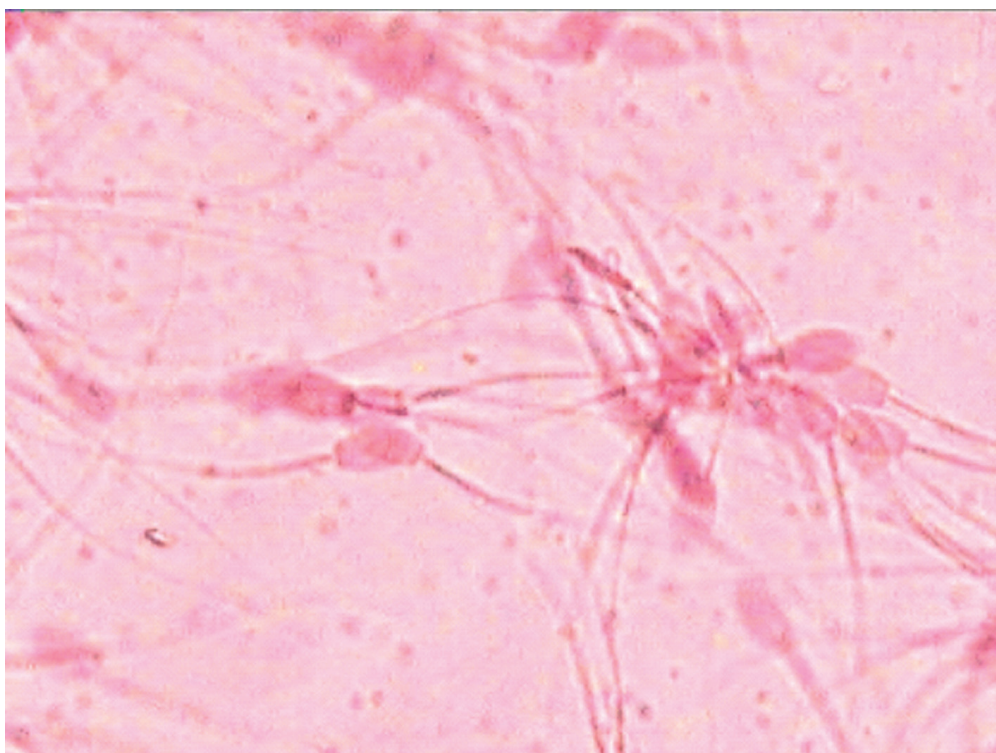
Fotografía N° 4. Cinco colores de las pecheras usadas para reconocer cada hembra servida.



Fotografía N° 5. Observación al microscopio del movimiento masal de semen de ovino.



Fotomicrografía N° 6. Muestra de semen de ovino sometida a test hipoosmótico.



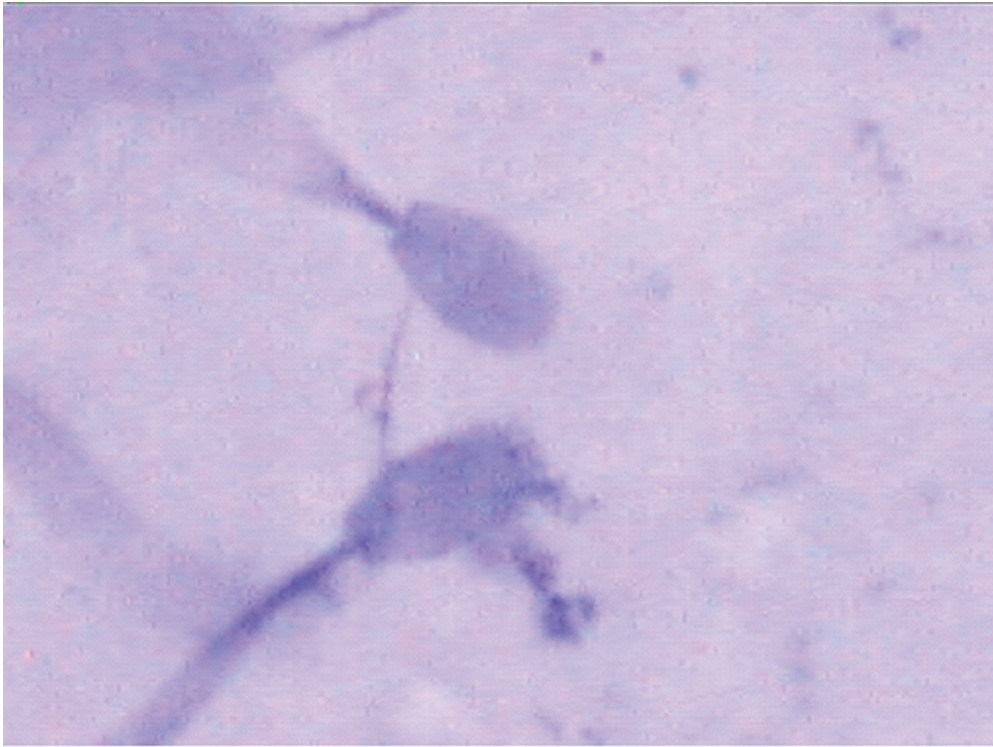
Fotomicrografía N° 7. Semen de ovino sometido a prueba de integridad de membrana con Eosina Y.



**Foto micrografía N° 8. Semen de ovino sometido a Buffer Borato (Control).
Tinción con Giemsa para ver cromatina, grado (0).**



**Fotomicrografía N° 9. Semen de ovino sometido a SDS.
Tinción con Giemsa para ver cromatina. Grado (1).**



**Fotomicrografía N° 10. Semen de ovino sometido a EDTA.
Tinción con Giemsa para ver cromatina. Grado (2).**